

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-200043

(P2008-200043A)

(43) 公開日 平成20年9月4日(2008.9.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 B	4 B 0 6 5
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 35/76 (2006.01)</b>	A 6 1 K 35/76	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 K 39/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/00 H	4 C 0 8 7
審査請求 有 請求項の数 17 O L (全 56 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-64188 (P2008-64188)  
 (22) 出願日 平成20年3月13日 (2008.3.13)  
 (62) 分割の表示 特願平8-515542の分割  
 原出願日 平成7年11月3日 (1995.11.3)  
 (31) 優先権主張番号 333, 680  
 (32) 優先日 平成6年11月3日 (1994.11.3)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 506269312  
 セル ジェネシス, インコーポレーテッド  
 アメリカ合衆国 94404 カリフォル  
 ニア州, フォスター シティ, レイクサ  
 イド ドライブ 322  
 (74) 代理人 100091096  
 弁理士 平木 祐輔  
 (74) 代理人 100096183  
 弁理士 石井 貞次  
 (72) 発明者 ワン, クィン  
 アメリカ合衆国 94303 カリフォル  
 ニア州, パロ アルト, ロス ロード 3  
 001

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規なアデノウイルスベクター、パッケージング細胞系、組換えアデノウイルスおよび方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 通常はアデノウイルス初期タンパク質に転写する少なくとも2つの初期領域遺伝子 (E 1 および E 4) の致死的欠失を有する点に特徴がある新規な複製欠損性アデノウイルスベクターの提供。






【解決手段】 少なくとも2つの初期領域DNA配列が欠失し、体細胞に対して外来性の治療的トランスジーンを送達することのできる第2および第3世代のウイルスベクターを構築した。これらの新規な組換えベクターは特にヒト遺伝子治療に用いられ、その際、該ベクターはE 1 またはE 4 領域と置き換わるトランスジーンまたは治療用遺伝子をさらに含有する。さらに、少なくともアデノウイルスE 1 およびE 4 遺伝子領域により形質転換され、前記の新規な複製欠損性アデノウイルスベクターを増殖させるように働く新規なパッケージング細胞系を構築した。

【選択図】 なし

**NOVEL ADENOVIRAL VECTORS, PACKAGING CELL LINES,  
RECOMBINANT ADENOVIRUS AND METHOD****Publication number:** JP2008200043 (A)**Publication date:** 2008-09-04**Inventor(s):** WANG QING; FINER MITCHELL H; JIA XIAO-CHI**Applicant(s):** CELL GENESYS INC**Classification:**

- international: C12N15/09; A61K35/76; A61K39/00; A61K48/00; A61P31/00;  
A61P35/00; C07K14/015; C07K14/075; C12N5/00; C12N5/10;  
C12N7/00; C12N15/861; C12N15/864; C12R1/91; C12N15/09;  
A61K35/66; A61K39/00; A61K48/00; A61P31/00; A61P35/00;  
C07K14/005; C12N5/00; C12N5/10; C12N7/00; C12N15/861;  
C12N15/864

- European: C07K14/015; C07K14/075; C12N15/861; C12N15/864A

**Application number:** JP20080064188 20080313**Priority number(s):** US19940333680 19941103**Also published as:** WO9614061 (A1) US5872005 (A) JP4167725 (B2) JP10508491 (T) EP0797436 (A1)

more &gt;&gt;

**Abstract of JP 2008200043 (A)**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a novel replication-deficient adenoviral vectors in which they harbor at least two lethal early region gene deletions (E1 and E4) that normally transcribe adenoviral early proteins. ; **SOLUTION:** The second generation and third generation of the viral vectors that have at least two lethal early region DNA sequence deletions and can deliver the exogenic therapeutic transgene to the body cells are constructed. These novel recombinant vector can particularly be used in human gene therapy treatment whereby the vectors additionally can carry a transgene or therapeutic gene that can replace the E1 or E4 regions. Further, novel packaging cell lines are provided that are transformed at a minimum with the adenoviral E1 and E4 gene regions and function to propagate the above novel replication-deficient adenoviral vectors. ; **COPYRIGHT:** (C) 2008, JPO&INPIT

---

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-200043

(P2008-200043A)

(43) 公開日 平成20年9月4日(2008.9.4)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	4 B 0 6 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	4 C 0 8 7
審査請求 有 請求項の数 17 O L (全 56 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-64188 (P2008-64188)  
 (22) 出願日 平成20年3月13日 (2008.3.13)  
 (62) 分割の表示 特願平8-515542の分割  
 原出願日 平成7年11月3日 (1995.11.3)  
 (31) 優先権主張番号 333, 680  
 (32) 優先日 平成6年11月3日 (1994.11.3)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 506269312  
 セル ジェネシス, インコーポレーテッド  
 アメリカ合衆国 94404 カリフォル  
 ニア州, フォスター シティ, レイクサ  
 イド ドライブ 322  
 (74) 代理人 100091096  
 弁理士 平木 祐輔  
 (74) 代理人 100096183  
 弁理士 石井 貞次  
 (72) 発明者  
 ワン, クィン  
 アメリカ合衆国 94303 カリフォル  
 ニア州, パロ アルト, ロス ロード 3  
 001

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規なアデノウイルスベクター、パッケージング細胞系、組換えアデノウイルスおよび方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 通常はアデノウイルス初期タンパク質に転写する少なくとも2つの初期領域遺伝子 (E 1 および E 4) の致死欠失を有する点に特徴がある新規な複製欠損性アデノウイルスベクターの提供。

【解決手段】 少なくとも2つの初期領域 DNA 配列が欠失し、体細胞に対して外来性の治療的トランスジーンを送達することのできる第2および第3世代のウイルスベクターを構築した。これらの新規な組換えベクターは特にヒト遺伝子治療に用いられ、その際、該ベクターは E 1 または E 4 領域と置き換わるトランスジーンまたは治療用遺伝子をさらに含有する。さらに、少なくともアデノウイルス E 1 および E 4 遺伝子領域により形質転換され、前記の新規な複製欠損性アデノウイルスベクターを増殖させるように働く新規なパッケージング細胞系を構築した。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

誘導プロモーターに機能しうる状態で連結された、細胞障害性タンパク質をコードするアデノウイルス遺伝子または遺伝子領域を含んでなる DNA プラスミド。

## 【請求項 2】

前記のアデノウイルス遺伝子または遺伝子領域が E 2 A 遺伝子または E 4 遺伝子領域から選択される、請求項 1 に記載の DNA プラスミド。

## 【請求項 3】

誘導プロモーターに機能しうる状態で連結された、タンパク質をコードするアデノ随伴ウイルス遺伝子を含んでなる DNA プラスミド。

10

## 【請求項 4】

前記のアデノ随伴ウイルス遺伝子が r e p 遺伝子領域および c a p 遺伝子領域から選択される、請求項 3 に記載の DNA プラスミド。

## 【請求項 5】

アデノ随伴ウイルスの R e p タンパク質の 1 つをコードし、かつ誘導プロモーターに機能しうる状態で連結されたアデノ随伴ウイルス遺伝子を含んでなる DNA プラスミド。

## 【請求項 6】

前記の誘導プロモーターが c A M P 応答要素結合性タンパク質により調節される遺伝子からのプロモーターである、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の DNA プラスミド。

20

## 【請求項 7】

前記の誘導プロモーターが哺乳動物  $\alpha$  インヒビンをコードする遺伝子から選択される、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の DNA プラスミド。

## 【請求項 8】

前記の誘導プロモーターがマウス  $\alpha$  インヒビンをコードする遺伝子から選択される、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の DNA プラスミド。

## 【請求項 9】

前記の誘導プロモーターがテトラサイクリン応答プロモーターをコードする遺伝子から選択される、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の DNA プラスミド。

## 【請求項 10】

A T C C # 7 5 8 7 9 を指定されたプラスミド p I K 6 . 1 M I P (  $\alpha$  ) - E 4 。

30

## 【請求項 11】

ウイルス構造遺伝子、E 1、E 2 A、E 4 初期遺伝子領域よりなる群から選択される少なくとも 2 つの欠失、少なくとも 2 つの変異、または少なくとも 1 つの変異と 1 つの欠失を有し、場合により E 3 遺伝子領域の欠失を含んでいてもよい複製欠損性の変異型アデノウイルスの増殖を支持するパッケージング細胞系。

## 【請求項 12】

ウイルス構造遺伝子、E 1、E 2 A、E 4 初期遺伝子領域よりなる群から選択される少なくとも 2 つの欠失、2 つの変異、または 1 つの欠失と 1 つの変異を有し、場合により E 3 遺伝子領域の欠失を含んでいてもよく、さらに前記の欠失のいずれか 1 つと置き換わるトランスジーンを含有する組換えアデノウイルスベクターの増殖を支持するパッケージング細胞系。

40

## 【請求項 13】

ヘルパーアデノウイルスを伴っていない複製欠損性の変異型アデノ随伴ウイルスの増殖を支持するパッケージング細胞系であって、ウイルス関連 RNA をコードする DNA 配列、E 1、E 2 A および E 4 初期遺伝子領域を含んでなるパッケージング細胞系。

## 【請求項 14】

ヘルパーアデノウイルスを伴っていない複製欠損性の組換えアデノ随伴ウイルスの増殖を支持するパッケージング細胞系であって、ウイルス関連 RNA 配列、E 1、E 2 A および E 4 初期遺伝子領域を含んでなるパッケージング細胞系。

## 【請求項 15】

50

ヘルパーアデノウイルスを伴っていない、アデノ随伴ウイルス *rep* 遺伝子領域の欠失を有する複製欠損性の変異型アデノ随伴ウイルスの増殖を支持するパッケージング細胞系であって、ウイルス関連RNA配列、E1、E2A、E4初期遺伝子領域、アデノ随伴ウイルス *rep* 遺伝子領域、および場合によりE3初期遺伝子領域を含んでなるパッケージング細胞系。

【請求項16】

ヘルパーアデノウイルスを伴っていない、アデノ随伴ウイルス *rep* 遺伝子領域の欠失を有する複製欠損性の組換えアデノ随伴ウイルスを産生するパッケージング細胞系であって、ウイルス関連RNAをコードするDNA配列、E1、E2A、E4初期遺伝子領域、アデノ随伴ウイルス *rep* 遺伝子領域、および場合によりE3初期領域を含んでなるパッケージング細胞系。

10

【請求項17】

ヘルパーアデノウイルスを伴っていない、アデノ随伴ウイルス *rep* 遺伝子領域の欠失を有する複製欠損性の変異型アデノ随伴ウイルスの増殖を支持するパッケージング細胞系であって、ウイルス関連RNA配列、E1、E2A、E4初期遺伝子領域、アデノ随伴ウイルス *rep* 遺伝子領域、アデノ随伴ウイルス *cap* 遺伝子領域、および場合によりE3初期遺伝子領域を含んでなるパッケージング細胞系。

【請求項18】

ヘルパーアデノウイルスを伴っていない、アデノ随伴ウイルス *rep* 遺伝子領域の欠失を有する複製欠損性の組換えアデノ随伴ウイルスを産生するパッケージング細胞系であって、ウイルス関連RNAをコードするDNA配列、E1、E2A、E4初期遺伝子領域、アデノ随伴ウイルス *rep* 遺伝子領域、アデノ随伴ウイルス *cap* 遺伝子領域、および場合によりE3初期遺伝子領域を含んでなるパッケージング細胞系。

20

【請求項19】

ウイルス構造遺伝子、E1、E2A、E4初期遺伝子領域よりなる群から選択される少なくとも2つの欠失、少なくとも2つの変異、または少なくとも1つの変異と1つの欠失を有し、場合によりE3遺伝子領域の欠失を含んでいてもよい、請求項11に記載のパッケージング細胞系において産生される複製欠損性の変異型アデノウイルス。

【請求項20】

ウイルス構造遺伝子、E1、E2A、E4初期遺伝子領域よりなる群から選択される少なくとも2つの欠失、少なくとも2つの変異、または少なくとも1つの変異と1つの欠失を有し、場合によりE3遺伝子領域の欠失を含んでいてもよい、複製欠損性の変異型アデノウイルス。

30

【請求項21】

ウイルス構造遺伝子配列、E1、E2A、E4初期遺伝子領域よりなる群から選択される少なくとも2つの欠失、少なくとも2つの変異、または少なくとも1つの変異と1つの欠失を有し、場合によりE3遺伝子領域の欠失を含んでいてもよい組換えアデノウイルスベクターであって、前記の欠失のいずれか1つと置き換わるトランスジーンをさらに含有し、請求項12に記載のパッケージング細胞系から産生される組換えアデノウイルスベクター。

40

【請求項22】

ウイルス構造遺伝子、E1、E2A、E4初期遺伝子領域よりなる群から選択される少なくとも2つの欠失、少なくとも2つの変異、または少なくとも1つの変異と1つの欠失を有し、場合によりE3遺伝子領域の欠失を含んでいてもよい組換えアデノウイルスベクターであって、前記の欠失のいずれか1つと置き換わるトランスジーンをさらに含有する組換えアデノウイルスベクター。

【請求項23】

E1、E2A、E4初期遺伝子領域、およびウイルス関連RNAをコードするDNA配列を含んでなるパッケージング細胞系において増殖する、ヘルパーアデノウイルスを伴っていない複製欠損性の変異型アデノ随伴ウイルス。

50

## 【請求項 24】

ウイルス関連RNA配列、E1、E2A、E4初期遺伝子領域、および場合によりE3初期遺伝子領域を含んでなるパッケージング細胞系において増殖する、ヘルパーアデノウイルスを伴っていない複製欠損性の組換えアデノウイルスベクター。

## 【請求項 25】

ウイルス関連RNAをコードするDNA配列、E1、E2A、E4初期遺伝子領域、アデノ随伴ウイルスrep遺伝子領域、および場合によりE3初期遺伝子領域を含んでなるパッケージング細胞系において増殖する複製欠損性の変異型アデノ随伴ウイルスであって、アデノ随伴ウイルスrep遺伝子領域の欠失を有し、かつヘルパーアデノウイルスを伴っていない変異型アデノ随伴ウイルス。

10

## 【請求項 26】

ウイルス関連RNAをコードするDNA配列、E1、E2A、E4初期遺伝子領域、アデノ随伴ウイルスrep遺伝子領域、および場合によりE3初期遺伝子領域を含んでなるパッケージング細胞系において増殖する複製欠損性の組換えアデノ随伴ウイルスベクターであって、アデノ随伴ウイルスrep遺伝子領域の欠失を有し、かつヘルパーアデノウイルスを伴わず、さらに前記の欠失と置き換わるトランスジーンを含有する組換えアデノ随伴ウイルスベクター。

## 【請求項 27】

ウイルス関連RNAをコードするDNA配列、E1、E2A、E4初期遺伝子領域、アデノ随伴ウイルスrep遺伝子領域、アデノ随伴ウイルスcap遺伝子領域、および場合によりE3初期遺伝子領域を含んでなるパッケージング細胞系において増殖する複製欠損性の変異型アデノ随伴ウイルスであって、アデノ随伴ウイルスrep遺伝子領域の欠失を有し、かつヘルパーアデノウイルスを伴っていない変異型アデノ随伴ウイルス。

20

## 【請求項 28】

ウイルス関連RNAをコードするDNA配列、E1、E2A、E4初期遺伝子領域、アデノ随伴ウイルスrep遺伝子領域、アデノ随伴ウイルスcap遺伝子領域、および場合によりE3初期遺伝子領域を含んでなるパッケージング細胞系において増殖する複製欠損性の組換えアデノ随伴ウイルスベクターであって、アデノ随伴ウイルスrep遺伝子領域の欠失を有し、かつヘルパーアデノウイルスを伴わず、さらに前記の欠失と置き換わるトランスジーンを含有する組換えアデノ随伴ウイルスベクター。

30

## 【請求項 29】

哺乳動物の標的細胞に、トランスジーンを含有する組換えアデノウイルスまたはアデノ随伴ウイルスを感染させる方法であって、

- i. 該標的細胞に、所定のトランスジーンを担う請求項 21、22、24、26または28に記載の組換えウイルスベクターを感染させ、そして
- ii. 該標的細胞において該トランスジーンを発現させる、

各工程を含んでなる方法。

## 【請求項 30】

請求項 29に記載の方法により生産されるトランスジーンを感染させた哺乳動物標的細胞。

40

## 【請求項 31】

前記の細胞が複製ヒト細胞、遅延複製ヒト細胞または非複製ヒト細胞よりなる群から選択される、請求項 30に記載の標的細胞。

## 【請求項 32】

ATCC#CRL11711を指定されたヒト胚腎細胞由来のパッケージング細胞系。

## 【請求項 33】

遺伝病または後天性疾患の治療方法であって、

- i. 治療用遺伝子からなるトランスジーンを含有する請求項 21、22、24、26または28に記載のアデノウイルス由来またはアデノ随伴ウイルス由来の組換えベクターを医薬として許容される用量で標的細胞に投与し、そして

50

ii. 該標的細胞において該治療用遺伝子を発現させて、遺伝病または後天性疾患を軽減させる、各工程を含んでなる方法。

【請求項 34】

請求項 21、22、24、26、28、36、55、57、59、60 または 62 に記載のアデノウイルス由来またはアデノ随伴ウイルス由来の組換えベクター、および製剤学的に許容される担体を含有するワクチン。

【請求項 35】

E1 および E4 初期遺伝子領域よりなる群から選択される少なくとも 2 つの欠失を有し、場合により E3 遺伝子領域の欠失を含んでいてもよく、さらに前記の欠失のいずれか 1 つと置き換わるトランスジーンを含有するアデノウイルスベクターの増殖を支持するパッケージング細胞系。

10

【請求項 36】

E1 および E4 初期遺伝子領域よりなる群から選択される少なくとも 2 つの欠失を有し、場合により E3 遺伝子領域の欠失を含んでいてもよく、さらに前記の欠失のいずれか 1 つと置き換わるトランスジーンを含有する組換えアデノウイルスベクター。

【請求項 37】

誘導プロモーターに機能しうる状態で連結されたアデノウイルス遺伝子断片 E4 オープンリーディングフレーム ORF6 を含んでなる DNA プラスミド。

20

【請求項 38】

前記の誘導プロモーターが cAMP 応答要素結合性タンパク質により調節される遺伝子から選択されたプロモーターである、請求項 37 に記載の DNA プラスミド。

【請求項 39】

前記の誘導プロモーターが哺乳動物  $\alpha$  インヒビンをコードする遺伝子から選択される、請求項 38 に記載の DNA プラスミド。

【請求項 40】

前記の誘導プロモーターがマウス  $\alpha$  インヒビンに由来するものである、請求項 39 に記載の DNA プラスミド。

【請求項 41】

前記の誘導プロモーターが薬剤誘導可能なテトラサイクリン応答プロモーターである、請求項 37 に記載の DNA プラスミド。

30

【請求項 42】

ATCC # 75879 を指定されたプラスミド p1K6.1M1P( $\alpha$ ) - E4 ORF6。

【請求項 43】

誘導プロモーターに機能しうる状態で連結されたアデノウイルス遺伝子 E2A を含んでなる DNA プラスミド。

【請求項 44】

前記の誘導プロモーターが cAMP 応答要素結合性タンパク質により調節される遺伝子から選択されたプロモーターである、請求項 43 に記載の DNA プラスミド。

40

【請求項 45】

前記の誘導プロモーターが哺乳動物  $\alpha$  インヒビンをコードする遺伝子から選択される、請求項 44 に記載の DNA プラスミド。

【請求項 46】

前記の誘導プロモーターがマウス  $\alpha$  インヒビンに由来するものである、請求項 45 に記載の DNA プラスミド。

【請求項 47】

前記の誘導プロモーターが薬剤誘導可能なテトラサイクリン応答プロモーターである、請求項 45 に記載の DNA プラスミド。

【請求項 48】

50

A T C C # 9 7 3 2 4 を指定されたプラスミド p I K 6 . 1 M I P ( α ) - E 2 A 。

【請求項 4 9】

E 1、E 2 A、E 4 - O R F 6 初期領域よりなる群から選択される少なくとも 2 つの欠失、少なくとも 2 つの変異、または少なくとも 1 つの変異と 1 つの欠失を有し、場合により E 3 遺伝子領域の欠失を含んでもよい、複製欠損性の変異型アデノウイルスまたは組換えアデノウイルスベクター（該組換えアデノウイルスベクターはさらに前記の欠失のいずれか 1 つと置き換わるトランスジーンを含有する）の増殖を支持するパッケージング細胞系。

【請求項 5 0】

E 1 および E 4 - O R F 6 初期遺伝子領域からの 2 つの欠失を有し、場合により E 3 遺伝子領域の欠失を含んでもよい、複製欠損性の変異型アデノウイルスまたは組換えアデノウイルスベクター（該組換えアデノウイルスベクターはさらに前記の欠失のいずれか 1 つと置き換わるトランスジーンを含有する）の増殖を支持するパッケージング細胞系。

10

【請求項 5 1】

A T C C # C R L 1 1 7 1 1 を指定された、アデノウイルス 5 E 4 O R F 6 D N A 遺伝子断片でトランスフェクトされたヒト胚腎細胞由来のパッケージング細胞系。

【請求項 5 2】

E 1 および E 2 A 初期遺伝子領域からの 2 つの欠失を有し、場合により E 3 遺伝子領域の欠失を含んでもよい、複製欠損性の変異型アデノウイルスまたは組換えアデノウイルスベクター（該組換えアデノウイルスベクターはさらに前記の欠失のいずれか 1 つと置き換わるトランスジーンを含有する）の増殖を支持するパッケージング細胞系。

20

【請求項 5 3】

テトラサイクリン応答プロモーターに機能しうる状態で連結された 1 以上のアデノウイルス後期遺伝子領域を含んでなる D N A プラスミド。

【請求項 5 4】

前記のアデノウイルス後期遺伝子領域が L 1、L 2、L 3、L 4 または L 5 から選択される、請求項 5 3 に記載の D N A プラスミド。

【請求項 5 5】

E 1 および E 4 初期遺伝子領域からの 2 つの欠失を有し、場合により E 3 遺伝子領域の欠失を含んでもよく、さらに前記の欠失のいずれかと置き換わるトランスジーンを含有する、組換えアデノウイルスベクター。

30

【請求項 5 6】

E 1 および E 4 初期遺伝子領域からの 2 つの欠失を有し、場合により E 3 遺伝子領域の欠失を含んでもよい、複製欠損性の変異型アデノウイルス。

【請求項 5 7】

E 1、E 2 A および E 4 初期遺伝子領域からの 3 つの欠失を有し、場合により E 3 遺伝子領域の欠失を含んでもよく、さらに前記の欠失のいずれかと置き換わるトランスジーンを含有する、組換えアデノウイルスベクター。

【請求項 5 8】

E 1、E 2 A および E 4 初期遺伝子領域からの 3 つの欠失を有し、場合により E 3 遺伝子領域の欠失を含んでもよい、複製欠損性の変異型アデノウイルス。

40

【請求項 5 9】

E 1 および E 2 A 初期遺伝子領域からの 2 つの欠失を有し、場合により E 3 遺伝子領域の欠失を含んでもよく、さらに前記の欠失のいずれかと置き換わるトランスジーンを含有する、組換えアデノウイルスベクター。

【請求項 6 0】

E 1 および E 2 A 初期遺伝子領域からの 2 つの欠失を有し、場合により E 3 遺伝子領域の欠失を含んでもよい、複製欠損性の変異型アデノウイルス。

【請求項 6 1】

前記のトランスジーンがヒト・ホスホグリセレートキナーゼプロモーターの制御下で発現

50



される、請求項 21、22、36、55、57 または 59 に記載の組換えアデノウイルスベクター。

【請求項 62】

前記のトランスジーンがヒト・ホスホグリセレートキナーゼプロモーターの制御下で発現される、請求項 26 または 28 に記載の組換えアデノ随伴ウイルスベクター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、ヒト遺伝子治療のための新規な複製欠損性アデノウイルスベクター、新規なパッケージング細胞系および組換えアデノウイルスに関する。特に、新規なパッケージング細胞系は、ヒトアデノウイルスの初期遺伝子領域 E1、E4 および場合により E3 の欠失のための相補機能を有する。

10

【背景技術】

【0002】

発明の背景

遺伝子移入ビヒクルとしての複製欠損性レトロウイルスベクターは、ヒト遺伝子治療のための基礎を提供する。レトロウイルスベクターは、ベクターでの感染を受けた細胞中でいかなるウイルスタンパク質も作られず、かつ更なるウイルス拡散が全く起こらないような形で、全てのウイルス遺伝子を除去するかまたは変性させることによって工学処理される。レトロウイルスベクターの伝播に必要とされるパッケージング細胞系の開発は、ヒト遺伝子治療の現実に向かっての最も重要なステップであった。遺伝子治療のためのレトロウイルスベクターの主要な利点は、高い遺伝子移入効率および細胞ゲノミック DNA 内への移入された遺伝子の精確な組込みにある。しかしながら、主たる欠点も同様にレトロウイルスベクターに付随して存在する。すなわち、非分裂細胞を形質導入する能力がレトロウイルスベクターにないこと、そして潜在的に挿入による変異誘発の可能性があること、である。

20

【0003】

ヒトアデノウイルスは、生ウイルスワクチンとして開発されてきたものであり、ヒト遺伝子治療のための *in vivo* 遺伝子送達ビヒクルに対するもう 1 つの代替物を提供する（非特許文献 1～6）。簡単に言うと、組換えアデノウイルスを大量に成長させ精製することができ、このアデノウイルスは、*in vivo* で広範な分裂および非分裂哺乳動物細胞を効率よく感染させることができる。その上、アデノウイルスゲノムは比較的容易に操作でき、かなり大きい DNA 挿入に対処することができる。

30

【0004】

現在利用可能な組換えアデノウイルスベクターの第 1 世代は、大部分の用途についてトランスジーンによって置換されるウイルス初期遺伝子領域 1（本明細書中で遺伝子地図ユニット 1.30～9.24 からの E1a および E1b 領域を含む、E1 と呼ぶ領域）における欠失を有している。トランスジーンというのは、ウイルスベクターによって運ばれ、宿主細胞中に形質導入される異種または外来性（外因性）の遺伝子である。ウイルス E1 領域の欠失は、組換えアデノウイルスを複製にとって欠損があり、しかもその後感染された標的細胞の中で感染性ウイルス粒子を産生することのできないものにする（非特許文献 7）。E1 欠失アデノウイルスを生成する能力は、293 と呼ばれるヒト胎芽腎臓パッケージング細胞系の利用可能性に基づいている。この細胞系は、E1 欠失ウイルス内で欠如している E1 領域遺伝子産物を提供するアデノウイルスの E1 領域を含有する（非特許文献 8）。しかしながら、現在の第 1 世代の組換えアデノウイルスの固有の欠点は、患者の体内で場合によって利用することに関して増々注目を集めてきている。最近のいくつかの研究は、E1 欠失アデノウイルスが完全に複製不能でないことを示した（非特許文献 9 および 10）。一般的な 3 つの制約条件は、アデノウイルスベクターテクノロジーに付随するものである。まず第 1 に、高い感染多重度（*m.o.i* と略する）でのアデノウイルスベク

40

50

ターによる *in vivo* および *in vitro* の両方の感染の結果、それ自体哺乳動物細胞に対する障害性をもつペンタタンパク質の蓄積による標的細胞に対する細胞障害性がもたらされた（非特許文献 11）。第 2 に、ペンタタンパク質を含むアデノウイルス晩期遺伝子産物に対する宿主免疫応答が、ベクターを受入れた感染組織の炎症性応答および破壊をひき起こす（非特許文献 12）。最後に、宿主免疫応答および細胞障害性効果が一緒になってトランスジーンの長期発現を妨げ、その後アデノウイルスベクターを投与した後の遺伝子発現レベルの低下をひき起こす（非特許文献 13）。

#### 【0005】

これらの障害を考えると、晩期ウイルス遺伝子タンパク質を発現するウイルスの能力、宿主細胞障害性応答の低下および宿主免疫応答の低下の見込みを弱めるためには、更にアデノウイルスベクターの設計における変更が必要とされる。Engelhardtらは、最近、*in vitro* での非許容的温度で晩期遺伝子産物を発現することのできない E1 欠失組換えアデノウイルスベクターの E2A コードされた DNA 結合性タンパク質（DBP）領域内で温度感応性（ts）変異を構築した（非特許文献 14）。このベクターによる感染を受けた動物の肝臓において、炎症性応答の減少およびトランスジーン発現の延長が報告された（Engelhardtら, 1994; 非特許文献 14）。しかしながら、ts DBP 変異は、*in vivo* で完全不活性遺伝子産物を生じさせることができず、したがって、晩期遺伝子発現を完全に遮断することができない。*in vivo* で完全に晩期遺伝子発現を遮断するためにアデノウイルス E1 欠失ベクターの中に第 2 の致死欠失を導入するような更なる技術的進歩が必要とされる。E1 および E4 遺伝子領域の欠失により複製欠損性にされた第 2（および第 3）世代の組換えアデノウイルスの産生に対処できる新規なパッケージング細胞系は、ヒト遺伝子治療のための安全かつ効率のよいベクターの開発に向けての最も有望なものである。本発明はこのようなパッケージング細胞系および結果として得られる変異型ウイルスおよび問題のトランスジーンを担持する組換えウイルスベクター（例えばアデノウイルスベクターまたは AAV 誘導ベクター）を提供する。

【非特許文献 1】Graham & Prevec, 「免疫学的問題に対する新たなアプローチ」Ellis(編), Butterworth-Heinemann, Boston, MA, p363~390(1992)

【非特許文献 2】Rosenfoldら, Science 252; 431-434(1991)

【非特許文献 3】Rosenfeldら, Cell 68; 143-155(1992)

【非特許文献 4】Ragotら, Nature 361; 647-650(1993)]

【非特許文献 5】Berkner, Biotechniques 6; 616-629(1988)

【非特許文献 6】Kozarsky & Wilson, Curr. Opin. Genet. Dev. 3; 499-503(1993)

【非特許文献 7】Berkner, Biotechniques 6; 616-629(1988)

【非特許文献 8】Grahamら, J. Gen Virol, 36; 59-72;(1977)]

【非特許文献 9】Rich, Hum. Gene. Ther. 4; 461-476(1993)

【非特許文献 10】Engelhardtら, Nature Genet, 4; 27-34(1993)

【非特許文献 11】(Kay, Cell Biochem. 17E; 207(1993)

【非特許文献 12】Yangら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA91; 4407-4411(1994)

【非特許文献 13】Mittalら, Virus Res. 28; 67-90(1993)

【非特許文献 14】Engelhardtら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA91; 6196-6200(1994)

【発明の開示】

#### 【0006】

##### 発明の概要

したがって、本発明は一般に、少なくとも 2 つの初期領域 DNA 配列が欠失し、体細胞に対して外来性の治療的トランスジーンを送達することのできる第 2 および第 3 世代のウイルスベクターを提供することによって、現在利用可能な第 1 世代のアデノウイルスベクターを使用する上で見られる問題点を軽減するための改良されたアデノウイルスベクター系を提供することを目的とする。

特に本発明は、少なくとも 2 つの致死的欠失、すなわち E1 および E4 初期領域遺伝子を宿した第 2 および第 3 世代の組換えアデノウイルスベクター（アデノウイルス）を提供す

る。場合によってはこのベクターは、E 3 初期遺伝子領域が欠失していてもよい。より特定的には、この組換えウイルスベクターは、E 1 または E 4 のいずれかの領域内に導入されたトランスジーン、例えば  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を担持する。更に特定のな 1 つの実施態様においては、組換えアデノウイルスは、E 1 または E 4 領域（または場合により E 3 領域）に置き換わる治療用遺伝子を含有してよく、この治療用遺伝子は、標的宿主細胞の中で発現および／または転写される。

#### 【0007】

本発明のもう 1 つの目的は、E 1、E 4 および場合により E 3 領域が欠失している欠損性アデノウイルスの E 1、E 4 そして場合により E 3 の遺伝子領域の機能を相補し、かくして、E 1、E 4 そして場合により E 3 の DNA 領域が欠損した上述の第 2 世代の組換えアデノウイルスベクターの産生を可能にする新規なパッケージング細胞系を提供することにある。ヒト胎芽腎細胞から誘導される好ましいパッケージング細胞系（293 細胞系）は、そのゲノム内に組込まれたアデノウイルス E 1 および E 4 遺伝子領域を含有する。特定の一実施態様においては、パッケージング細胞系は、本明細書中で 293-E 4 として同定されており、ブダペスト条約に基づき American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland に 1994 年 8 月 30 日付けで寄託され、そこで ATCC# CRL11711 という呼称を受けている。

10

#### 【0008】

本発明のもう 1 つの目的は、E 1、E 4 および場合により E 3 の領域が欠失した欠損性アデノウイルスの E 1、E 4 および場合により E 3 の遺伝子領域の機能を相補し、かくして E 1、E 4 および場合により E 3 の DNA 領域が欠損した上述の第 2 世代の組換えアデノウイルスベクターの産生を可能にする新規なパッケージング細胞系を提供することにある。ヒト胎芽腎細胞から誘導された好ましいパッケージング細胞系（293 細胞系）は、293 細胞ゲノム内に組込まれた Ad5 E 4 遺伝子の最小必須 ORF6 領域およびアデノウイルス E 1 を含有する。特定の実施態様においては、パッケージング細胞系は本明細書で 293-ORF6 として同定され、ブダペスト条約に基づいて American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland に 1995 年 10 月 25 日付けで寄託され、そこで ATCC# CRL11990 という呼称を受けている。

20

#### 【0009】

本発明のもう 1 つの目的は、E 1、E 2 A および場合により E 3 領域が欠失している欠損性アデノウイルスの E 1、E 2 A そして場合により E 3 の遺伝子領域の機能を相補し、かくして、E 1、E 2 A そして場合により E 3 の DNA 領域が欠損した上述の第 2 世代の組換えアデノウイルスベクターの産生を可能にする新規なパッケージング細胞系を提供することにある。ヒト胎芽腎細胞から誘導された好ましいパッケージング細胞系（293 細胞系）は、293 細胞ゲノム内に組込まれたアデノウイルス E 1 および E 2 A 遺伝子領域を含有する。

30

#### 【0010】

本発明のもう 1 つの目的は、E 1、E 2 A、E 4 および場合により E 3 領域が欠失している欠損性アデノウイルスの E 1、E 2 A、E 4 そして場合により E 3 の遺伝子領域の機能を相補し、かくして、E 1、E 2 A、E 4 そして場合により E 3 の DNA 領域が欠損した上述の第 2 および第 3 世代の組換えアデノウイルスベクターの産生を可能にする新規なパッケージング細胞系を提供することにある。ヒト胎芽腎細胞から誘導される好ましいパッケージング細胞系（293 細胞系）は、293 細胞ゲノム内に組込まれたアデノウイルス E 1、E 2 A および E 4 遺伝子領域を含有する。

40

#### 【0011】

本発明のもう 1 つの目的は、293 細胞内に E 4 領域を導入するのに使用されるプラスミドを提供することにある。この細菌プラスミドは、E 4 プロモーターが欠如ししかも  $\alpha$ -インヒビン、 $\beta$ -インヒビン、 $\alpha$ -ゴナドトロフィン、シトクロム C、シトクロム C オキシダーゼ複合体（サブユニット IV）およびグルカゴンといったような CRE 結合性タンパク質によって調節される細胞誘導ホルモン遺伝子で置換されたアデノウイルス E 4 領域

50

を含んで成る。E 4 遺伝子領域は、上述のプラスミド内でCREBプロモーターに機能している状態で連結されている。特定の一実施態様においては、プラスミドは、上述のアデノウイルス、およびpIK6.1MIP( $\alpha$ )-E 4として同定され、ブダペスト条約に基づいて1994年8月30付けでATCCに寄託され、そこでATCC#75879という呼称を受けたマウスアルファ( $\alpha$ )-インヒビンプロモーターを含んで成る。

本発明の更にもう1つの目的は、293細胞内に最小必須E 4 遺伝子領域、つまりオープンリーディングフレーム(ORF 6)領域を導入するプラスミドを提供することにある。細菌プラスミドは、E 4プロモーターが欠如し、しかも $\alpha$ -インヒビン、 $\beta$ -インヒビン、 $\alpha$ -ゴナドトロフィン、シトクロムC、シトクロムCオキシダーゼ複合体(サブユニットIV)またはグルコカゴンといったようなCRE結合性タンパク質によって調節される細胞誘導ホルモン遺伝子プロモーターで置換されたE 4 遺伝子領域のアデノウイルスORF 6断片を含んで成る。ORF 6断片は、上述のプラスミド内のCREBプロモーターに機能している状態で連結されている。特定の実施態様においては、プラスミドは、アデノウイルスORF 6断片および、pIK6.1MIP( $\alpha$ )-ORF 6として同定され、ブダペスト条約に基づき1995年10月25日付けでATCCに寄託され、そこでATCC#97325という呼称を受けたマウス $\alpha$ -インヒビンプロモーターを含んで成る。

#### 【0012】

本発明の更にもう1つの目的は、293細胞内にアデノウイルスDNA結合性タンパク質(DBP)をコードするアデノウイルス5E 2A遺伝子を導入するプラスミドを提供することにある。細菌プラスミドは、E 2Aプロモーターが欠如し、しかも $\alpha$ -インヒビン、 $\beta$ -インヒビン、 $\alpha$ -ゴナドトロフィン、シトクロムC、シトクロムCオキシダーゼ複合体(サブユニットIV)またはグルコカゴンといったようなCRE結合性タンパク質によって調節される細胞誘導ホルモン遺伝子プロモーターで置換されたアデノウイルスE 2A遺伝子領域を含んで成る。E 2A遺伝子断片は、上述のプラスミド内のCREBプロモーターに機能している状態で連結されている。特定の実施態様においては、プラスミドは、アデノウイルスE 2A遺伝子および、pIK6.1MIP( $\alpha$ )-E 2Aとして同定され、ブダペスト条約に基づき1995年10月25日付けでATCCに寄託され、そこでATCC#97324という呼称を受けたマウス $\alpha$ -インヒビンプロモーターを含んで成る。

本発明の更にもう1つの目的は、in vivoおよびex vivo遺伝子治療のためのトランスジェンを担持する、上記で同定された第2または第3世代の組換え型ウイルスベクターで哺乳動物標的細胞を感染させる方法を提供することにある。

#### 発明の詳細な説明

現行の初期領域欠失アデノウイルスベクターに付随する問題を避けるように設計された1つの戦略は、アデノウイルスベクター内に第2の必須遺伝子領域欠失を導入することにある。それぞれE 1、E 2AまたはE 4の突然変異体ウイルスの増殖を支持する複数のアデノウイルス初期遺伝子領域で形質転換された細胞系が立証されてきた[Grahanら, J. Gen Virol. 36: 59-72(1977), Weinburgら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA80: 5383-5386(1983)およびBroughら, Virology 190: 624-634(1992)]。しかしながら、いかなる細胞系も、2つの遺伝子領域の機能を同時にかつ許容的温度で提供することはない。トランスでの第2の必須遺伝子領域機能(例えばE 4)およびE 1を相補する能力、およびこのような2重(またはできれば3重または4重)の欠失を含有する組換えウイルスベクターの伝播のためのパッケージング細胞系として機能する能力を有するこのような細胞系を樹立することにより、現在利用可能な第1世代のアデノウイルスベクターの欠点を削除することができる。

#### 【0013】

アデノウイルス初期領域(E R)遺伝子機能の研究により、E 4領域の欠失の結果、ウイルス後期転写産物を蓄積することができなくなり、ウイルス後期タンパク質合成の低減がもたらされ、ウイルス粒子組立ての欠陥がみられ、後期感染段階において宿主タンパク質合成を阻害することができなくなる、ということがわかった[Sandlerら, J. Virol. 63: 624-630(1989), Bridge & Kether, Virology 174: 345-353(1990), Rose & Ziff, J. V

iroi, 66; 3110-3117(1992), Bridgeら, Virology 193; 794-801(1993)およびBettら, J. Virol, 67; 5911-5921(1993)]。したがって、組換え型アデノウイルスベクターからの E 1 および E 4 遺伝子領域の 2 重の除去により、標的細胞に対する直接的細胞障害性の病原性効果およびヒトの体内における炎症性応答を劇的に最小限におさえるかまたは除去することができる。第 2 世代の組換え型アデノウイルスベクター内の E 4 欠失は、10 kb という大きいヒト遺伝子インサートを収容するこのベクター系の容量を増大させるという付加的な利点を提供することになる。

#### 【0014】

本発明の一つの局面においては、E 1 および E 4 欠損性アデノウイルス内の E 1 および E 4 の両方の欠失の成長を支持する新規なパッケージング細胞系の樹立の成功が立証された。E 1 b 遺伝子産物 (496R タンパク質) と結びつけられた状態における E 4 遺伝子産物 [オープンリーディングフレーム (ORF) 6 の 294R タンパク質] の 1 つは細胞 mRNA 輸送を阻害する機能を持ち、その結果、細胞タンパク質合成が停止するため (Bridge & Ketner, 1990)、E 4 遺伝子領域の過剰発現は究極的に細胞の死枯を結果としてもたらすものと予想される。

#### 【0015】

293 細胞内への E 4 遺伝子領域の導入に対する主要な障害、すなわち、そうでなければ細胞の死枯を結果としてもたらしたと思われる E 4 遺伝子の過剰発現をひき起こす親 293 細胞内の E 1 a 遺伝子産物のトランス活性化が克服されてきた。本発明においては、E 4 プロモーターを、細胞誘導ホルモン遺伝子プロモーター、すなわち CRE 結合性タンパク質 (CREB) と呼ばれる核因子により調節される遺伝子で置換する。特に、E 4 プロモーターに置き換わるプロモーターは、KimらのJ. Biol. Chem., 268; 15689-15695(1993)の中の15695頁にある表 I にリストアップされた  $\alpha$ -インヒビン、ベータ ( $\beta$ ) -インヒビン、 $\alpha$ -ゴナドトロピン、シトクロム C、シトクロム C オキシダーゼ複合体 (サブユニット IV)、グルカゴンなどといった CREB で調節された遺伝子ファミリーの中から選ばれる。好ましい実施態様においては、CREB で調節された遺伝子プロモーターは、哺乳動物  $\alpha$ -インヒビン、最も好ましくはマウス  $\alpha$ -インヒビンである。この場合、マウスインヒビンプロモーター領域の 165 塩基対配列が、低い塩基性レベルで異種遺伝子発現を駆動し、cAMP またはアデニルシクラーゼ活性化体の誘導に応答して異種遺伝子発現のレベルを増大させることが示された [Su & Hsueg, Biochem. and Biophys. Res. Commun, 186, 293-300(1992)]。cAMP 応答要素 (CRE) と呼ばれる 8 bp のパリンδροーム配列がこの誘導効果を担当しており、インヒビンプロモーター領域内で同定された。実際には、全てのアデノウイルス初期遺伝子プロモーターは、これらの初期遺伝子を cAMP の誘導に対する応答性をもつものにする CRE 様の要素を含有している [Jonesら, Genes Dev. 2; 267-281(1988)]。E 1 a トランス活性化および cAMP 増強が、独立したメカニズムを介してアデノウイルス初期遺伝子に対し作用を及ぼすことは明白である [Leza & Hearing, J. Virol. 63; 3057-3064(1989)およびLeeら, Mol. Cell. Biol. 9; 4390-4397(1989)]。マウス  $\alpha$ -インヒビンプロモーターでの E 4 プロモーターの置換は、E 4 遺伝子上の cAMP 誘導から E 1 a トランス活性化を切り離す。本発明においては、293 細胞内に E 4 領域の全長配列が導入され、かくして cAMP の誘導は形質転換された細胞内での制御された形での E 4 遺伝子発現においてなお有効である。同様に、この新規な 293-E 4 パッケージング細胞系は、E 3 領域の欠失がウイルスの生存可能性に影響を及ぼさないことから、E 1 および E 4 欠失に加えて E 3 の欠失を含有するアデノウイルスを救済することもできる (その増殖を支持する)、ということにも留意すべきである。

#### 【0016】

本発明によると、Finerら, 1994 および Finerら W094/29438 の中で記述されている標準的クローニング手順および出発物質を用いて、細菌プラスミドが調製される。親プラスミド pIK6.1 MMSV-E4 ( $\Delta$ E4 pro) は pIK6.1. MMSV Nhe (Finerら W094/29438) から誘導され、MMSV プロモーターで置き換えられて E 4 プロモーターが存在しないことを除いてアデノウイルス E 4 領域の全長配列を含む。当該技術分野にお

10

20

30

40

50

いて周知のものであるクローニング技術を用いて、MMSVプロモーターは、上述のCREBで調節されたプロモーターの1つと置換される。好ましい実施態様においては、アデノウイルスのプロモーターなしのE4遺伝子領域に機能しうる状態で連結されたプロモーターは、最も好ましくはマウスから誘導されたものである哺乳動物のアルファインヒビンである。結果として得られる好ましいプラスミドは、pIK6.1MIP( $\alpha$ )-E4と呼称され、ブダベスト条約の条項に基づいてATCC, Rockville, MDにATCC#75879として寄託されている。CREBで調節され、アデノウイルスE4遺伝子断片、ORF6またはアデノウイルスE2A遺伝子に対して機能しうる状態で連結されたプロモーターを含むプラスミドは、出発物質として上述のpIK6.1MIP( $\alpha$ )-E4プラスミドを用いて構築された。プロモーターなしのE4領域は、 $\alpha$ -インヒビンプロモーターに機能しうる状態で連結されるpIK6.1MIP( $\alpha$ )-ORF6およびpIK6.1MIP( $\alpha$ )-E2Aプラスミドを構築するべく、E4遺伝子またはE2A遺伝子領域のORF6断片のPCR産物と置換した。それぞれATCC#97325およびATCC#97324をもつマウス( $\alpha$ )-インヒビンに機能しうる状態で連結された上述のORF6およびE2Aのプラスミドの特性をもつプラスミドが、ATCC, Rockville, MDに寄託された。本発明によると、インヒビンプロモーターの置換においてCREBで調節されたプロモーターのいずれかを使用し、プラスミドが以下で記述するパッケージング細胞系内にトランスフェクションされた時点で類似の結果を達成することができる。

#### 【0017】

新規な293-E4パッケージング細胞系はE4領域により安定した形で形質転換され、親293細胞と同じ形態および増殖速度を示した。このことはすなわち、マウス $\alpha$ -インヒビンプロモーターの制御下での低レベルのE4遺伝子発現が宿主細胞タンパク質合成の広範な阻害をひき起こさないということを表わす。

#### 【0018】

変異型アデノウイルス、H5d11014 (Bridgeら, Virology 193: 794-801(1993))は、E4領域内に致死欠失を担持し、W162細胞内でのみ増殖しうることから、上述の293-E4パッケージング細胞系の相補的活性を検査するために用いられた(Bridge & Ketner, 1989)。W162細胞系は、アデノウイルスE4DNAによって形質転換されたベロ(サルの腎臓)細胞系であり、E4欠失アデノウイルスの増殖を相補する。H5d11014ウイルスは、著しく減少したレベルのDNAを産生することが示されており、そのほとんど欠失したE4領域内で無傷のORF4に起因して後期タンパク質を合成することができなかった[Bridgeら, (1993)]。W162細胞内で産生されたものに匹敵する力価でH5d11014ウイルスを産生した細胞系が発見された(以下の実施例11中の表IV、1群および2群を参照のこと)。

#### 【0019】

もう1つの実施態様においては、本発明は、本発明の新規なパッケージング細胞系によって産生される新規な組換えアデノウイルスまたは変異型アデノウイルスに関する。本明細書に記述されている「組換えアデノウイルス」または「組換えアデノ随伴ウイルス」(当該技術分野では組換えウイルスベクターとしても知られている)というのは、ゲノムが単数または複数のヌクレオチドの欠失、挿入および/または置換を含むウイルスのことを指し、このウイルスは更にトランスジーンを担持している。本明細書では「変異型ウイルス」というのは、ゲノムが単数または複数のヌクレオチドの欠失、挿入および/または置換を含む、例えばアデノウイルスおよびAAVといった特定のウイルスのことを言うが、変異型ウイルスにはいかなるトランスジーンも担持されていない。この実施の1つの特定の局面においては、上述の新規293-E4パッケージング細胞系は、Ad5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal) $\Delta$ E4と呼ばれる組換えウイルスの第2世代を生成するのに用いられる。293-E4パッケージング細胞系は、アデノウイルス血清型5E1およびE4遺伝子領域を内含しているが、アデノウイルス血清型の間での高レベルの構造的および機能的相同性のため、例えば血清型2、7および12といったその他の血清型の変異型および組換えアデノウイルスも救済することが可能である。更に、血清型5以外の血清型からの変異型お

よび組換えアデノウイルスを、以下に記述する本発明のその他のアデノウイルスパッケージング細胞系から救済することができる。

#### 【0020】

In vitro研究は、非許容的ヒト細胞内での本発明の新規な組換えアデノウイルスベクターの感染がいかなる細胞変性効果も示さず、トランスジーン発現の効率は従来のE1欠失ウイルスに匹敵しうるレベルにある、ということを立証している。本発明の新規な第2世代組換えアデノウイルスの感染を受けた部位での宿主免疫応答および炎症反応は、現在利用可能な第1世代の組換えアデノウイルスに比べて低減するものと予想されている。本発明の2重相補性パッケージング細胞系の樹立は、より安全でかつより効果的な遺伝子移入アデノウイルスベクターの進化において有意義な画期的出来事である。本発明の293-E4細胞系の構築において用いられる方法は、本発明のアデノウイルスベクターの更なる欠失を相補する付加的なアデノウイルス領域を含むその他のパッケージング細胞系の産生およびその他のウイルスベクターの構築において一般に有用なものである。

#### 【0021】

かくして、もう1つの実施態様においては、本発明は、上述の方法によりE1、E4および場合によりE3に加えて欠失を救済することのできる新規なアデノウイルスパッケージング細胞系に関する。この例においては、E1、E3およびE4の欠失に加えてE2A変異または欠失を救済することのできるアデノウイルスベクターパッケージング細胞系が、上述の新規なパッケージング細胞系、すなわち293-E4パッケージング細胞系から出発して構築された。E2A遺伝子産物は、調節タンパク質、具体的にはDNA結合性タンパク質である。この遺伝子は、上述のような類似の仕方でもE2A遺伝子に対し機能しうる状態で連結された誘導プロモーターの制御下にE2A遺伝子を置くことによって、293-E4パッケージング細胞系内に導入され得る。誘導プロモーターは、E2遺伝子プロモーターを置換するのに使用される上述のCREB調節された遺伝子と同じファミリーから選択することができる。

#### 【0022】

更にもう1つの実施態様においては、本発明は、最小必須シス要素（逆転した末端反復（ITRs）およびパッケージングシグナル配列）[Heringら, Virol. 61; 2555-2558(1987)] およびタンパク質9配列 [Ghosh-Choudhuryら, EMBO J. 6; 1733-1739(1987)] のみを含むアデノウイルス組換えウイルスを救済することのできるアデノウイルスベクターパッケージング細胞系に関する。この細胞系は、m.u.11.2前後から約99までのアデノウイルスDNA配列を上述の新規293-E4細胞系内に導入することによって樹立することができる。上述のアデノウイルスDNA配列を担持するプラスミドを構築し、293細胞内にトランスフェクションすることができる。このDNA配列は、E1b遺伝子の後からウイルス構造遺伝子の3'末端までの配列を表わす[Sanbrookら, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39; 615-632(1974); Ziff & Evans, Cell 15; 1463-1476(1978)]。導入されたアデノウイルス配列はウイルス構造遺伝子および、E1aおよびE1bを除くほぼ全ての機能的遺伝子領域を含む。ウイルス遺伝子産物の構成的発現または過剰発現は細胞にとって非常に障害性があることから、異種プロモーターとアデノウイルス未変性プロモーターを置換させるべく、導入されたアデノウイルスDNAを操作することができる。例えば、ウイルス調節タンパク質をコードする初期遺伝子領域を、約2~10倍の誘導効率をもつCREB調節されたプロモーターの制御下に置くことができる。ウイルス構造タンパク質をコードする遺伝子領域の場合、未変性主要後期プロモーターを、テトラサイクリンの存在下で最高約10<sup>5</sup>倍の誘導レベルをもつテトラサイクリン応答性プロモーターといったような密に制御された外因性プロモーターにより置換させることができる [Manfred & Hermann, PNAS 89; 5547-5551(1992)]。

#### 【0023】

もう1つの実施態様においては、本発明は、以下の仕方でも調製された新規のアデノウイルス随伴（AAV）パッケージング細胞系に関する。新規な相補性細胞系は、E1a、E1b、E2A、およびE4遺伝子領域およびウイルス関連RNAをコードするDNA配列

を含む。この細胞系は、ウイルス関連RNAをコードするアデノウイルスDNA配列 (m. u. 28~30からの600NTs前後) [Mathews, Cell 6; 223-229(1975)およびPettersson & Philipson, Cell 6; 1-4(1975)] を、E1およびE4欠失、アデノウイルスのE2A変異、並びに場合によりE3を救済する上述の通り構築した新規の293-E4パッケージング細胞系の中へ導入することによって構築できる。このパッケージング細胞系から産生される野生型AAVは、ヘルパーアデノウイルスを伴っていない。組換えアデノ随伴ウイルスまたは変異型AAVは最小必須シス要素を含んでいるにすぎず、パッケージングについては欠損性であるものの野生型AAV遺伝子産物を供給する非パッケージング相補性AAVプラスミドを同時トランスフェクションすることによって生成されることになる。[Samulskiら, J. Virol. 61; 3096-3101(1987)]。更に、この細胞系から救済された組換えアデノ随伴ウイルスのベクターまたは変異型AAVは、ヘルパーウイルス、すなわちアデノウイルスを伴わない。

10

## 【0024】

もう1つの実施態様においては、本発明は、上述のAACパッケージング細胞系から出発して構築された、更にもう1つの新規のAAVパッケージング細胞系に関する。このパッケージング細胞系は、E1a、E1b、E2AおよびE4遺伝子領域、ウイルス関連RNAをコードするDNAそして付加的にAAVウイルス複製(rep)遺伝子領域を内含する。このrep遺伝子領域は、AAV遺伝子発現のトランス調節およびAAV DNA複製にとって必須の少なくとも4つの複製(Rep)タンパク質をコードする。[(概要についてはBervis & Bolienzsky, Adv. Virus Res. 32; 243-306(1987)を参照のこと)。これは、P5プロモーター[(Yangら, J. Virol. 68; 4847-4856(1994)]を前述のCREB調節された遺伝子ファミリーから選ばれた誘導プロモーターで置換する仕方で、E1、E2A、E4遺伝子領域およびウイルス関連RNAをコードするDNA配列をすでに含んでいる上述のAAVパッケージング系の中にAAV rep遺伝子領域を導入することによって構築される。新規AAVウイルスおよび細胞系から救済されたその組換えウイルスはヘルパーウイルス(アデノウイルス)を伴わず、Repである[Muzyczka, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158; 97-129(1992)]。

20

## 【0025】

もう1つの実施態様においては、本発明は、前の段落で記述したAAVパッケージング細胞系から出発して構築されるもう1つの新規なAAVパッケージング細胞系に関する。このパッケージング細胞系は、E1a、E1b、E2A、E4遺伝子領域、ウイルス関連RNAをコードするDNA、AAVウイルス複製(rep)遺伝子領域、そして付加的にはAAVキャップ遺伝子領域を含む。キャップ遺伝子領域は、キャプシドタンパク質ファミリー、すなわちVP1、VP2およびVP3をコードする[Janikら, J. Virol. 52; 591-597(1984)]。3つのmRNA全ての合成はp40と呼ばれる単一のプロモーターから開始される[Janikら, (1984)]。この遺伝子領域は、CREBで調節されたプロモーターまたはテトラサイクリン応答プロモーターのいずれかから選択された誘導プロモーターでp40プロモーターを置換することによって上述のAAVパッケージング細胞系内に導入されることになる。新規なAACウイルスおよび細胞系から救済されたその組換えウイルスはヘルパーウイルス(アデノウイルス)を伴わず、最小必須シス要素を含んでいるにすぎない[Muzyczka, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158; 97-129(1992)]。

30

40

## 【0026】

更にもう1つの実施態様においては、本発明は、E1およびE4の両方が欠失したベクターおよびウイルスの伝播のための特定の2世代パッケージング細胞系を提供する。この系は、マウス $\alpha$ -インヒビンプロモーターによって駆動される最小必須E4遺伝子領域、すなわちオープンリーディングフレーム6(ORF6)領域の導入によって樹立され、上述の293-E4と呼称される細胞系と同じ機能を提供する。E1、E4および2重欠失組換えアデノウイルスベクターの産生のためにこのパッケージング細胞系を使用することによって、E4領域内で考えられるあらゆる相同な組換え事象の問題が削除されるものと予想される。かくして、例えばE1/E4欠失組換えアデノウイルスの精製された系統の

50



拡張および継代は、複製応答能もあるアデノウイルス（RCA）粒子によるいかなる汚染も全く伴わないものでなくてはならない。このより安全な2重パッケージング細胞系を作り出す戦略は、E4遺伝子領域の全長の代わりに293細胞内に、ORF6コーディング領域（ゲノムの右端からAd5ヌクレオチド1876-2756）のみを含む910bpのDNAフラグメントを導入することにあった。既存のE4欠失変異ウイルスは数多くある。重大な欠損性表現型を示すものは全て、ORF6の領域を超えて実質的に延びるE4欠失を伴っている。例えば、これらの欠失のうちのいくつかは以下の通りである。すなわち、H5d11014のE4領域内の2つの欠失の境界としてのNTs575~2845；H5d1366内の欠失の同じ終点；H2d1808の縦列反復配列内の932/937から2942/2945；およびH5d11004内の981から2845。組込まれたORF6 DNA断片と、大きなE4領域欠失を担持する組換えアデノウイルスベクターの間に重複する配列が欠如していることから、相同組換えを通してのE4欠失の修復は本質的にゼロとなる。

10

#### 【0027】

以前の報告書は、ORF3またはORF6遺伝子断片のいずれかは単独で、正常なアデノウイルスの生活環に必要なE4機能を提供するのに充分である、ということを示していた。ORF3およびORF6遺伝子セグメントは、ウイルスのDNA複製、後期ウイルスmRNAの輸送および蓄積そして宿主細胞の締め出しに関与する多重機能をもつものと考えられている。E4領域のその他のORFはウイルスの増殖において重要な調節の役割を有するが、これらはなくても済むものである。本発明の、提供された293-ORF6細胞系が無傷のE1およびORF6 DNA配列を含んでいるのみならずE1およびE4機能の相補活性も有することを確認するため、E1欠失変異ウイルス、E4欠失変異ウイルス並びにE1/E4欠失組換えウイルスを用いて293-ORF6細胞系を感染させた。

20

#### 【0028】

個々の293-ORF6単層上で測定されたこれらのウイルスの力価は、各ウイルスの許容的細胞系上で測定された力価に対し相容性あるものであることが示された。したがって、本発明の293-E1/ORF6パッケージング細胞系は、人間の患者に使用するための安全性の必要条件を満たすのみならず、E1またはE4欠失変異ウイルスおよび2重欠失E1/E4ウイルスおよびベクターを効果的に産生する。この細胞系は、1955年10月25日付けでRockville, MDのATCCに寄託され、ATCC#CRL11990という呼称が与えられた。

30

#### 【0029】

もう1つの実施態様においては、本発明は、同時にトランスでE1およびE2A遺伝子の両方の機能を相補する293-E2Aパッケージング細胞系を提供する。ヒトアデノウイルスの72Kd DNA結合性タンパク質（DBP）は、ウイルスの感染サイクルにおいて重要である。非許容的温度では、DBPコーディング領域（E2A領域）内のts変異はウイルスDNA複製を阻害して[Friefeldら, Virology 124: 380-389(1983)]、ウイルスの生活環の晩期段階において初期遺伝子発現を調節することができない[Carterら, J. Virol. 25: 664-674(1978)]。E1欠失しE2Aが変異した（ts変異）アデノウイルスベクターの生成は特殊なパッケージング細胞系を必要としないが、ts DBP変異は、温度許容的in vivo条件下で完全不活性遺伝子産物を生み出し得ない[Engelhardtら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 6196-6200(1994)]。E2A遺伝子の不可欠領域（DBPのカルボキシ末端部分をコードする遺伝子領域）内に1つでも欠失があれば、それはアデノウイルスにとってin vitroおよびin vivoの両方において致死性である[Vosら, Virology 172: 634-642(1989)]。E1およびE2A遺伝子領域の両方の欠失を含む組換えベクターを生成するためには、相補細胞系の樹立が絶対に必要となる。本発明は、組換えアデノウイルスベクターおよび変異型アデノウイルスが作り出されるアデノウイルスパッケージングシステムを提供する。組換えアデノウイルスベクターのE1欠失およびE2A欠失の組合せの結果、完全な複製機能不全および人体内での使用のための更なる安全性がもたらされるものと予想される。

40

50

## 【0030】

更にもう1つの実施態様においては、本発明は更に、同時にトランスでアデノウイルスE1、E2AおよびE4遺伝子領域の機能を相補することのできる3重パッケージング細胞系を提供している。このパッケージング細胞系から生成された組換えアデノウイルスベクターは、より大きいサイズのトランスジーン挿入のための広範な容量という付加的な利点を伴って、パッケージングされたアデノウイルスベクターを全てのヒト利用分野にとって絶対的に安全なものにする3つの初期遺伝子領域欠失を収容している。

## 【0031】

本発明は更に、標的細胞内で発現されることになるトランスジーンを含む新規の組換えアデノウイルスおよびAAV（本明細書では組換えアデノウイルス誘導ベクターおよびAAV誘導ベクターとも呼ばれている）および新規な変異型ウイルス（特にアデノウイルスおよびAVV）の産生をも提供する。組換えアデノウイルス誘導およびAAVウイルスベクターは、新規な組換えアデノウイルス誘導およびAAV誘導ベクター内に存在せずウイルスの複製にとって必須であるアデノウイルスまたはAAVゲノムの部分を相補することのできる単数または複数の全く異なるヌクレオチド配列を含む上述のパッケージング細胞系を用いて調製される。組換えアデノウイルス誘導およびAAV誘導ベクターはもはや、感染した標的細胞内でのウイルス複製のために必要とされる遺伝子を内含しなくなる。より特定の言うと、組換えアデノウイルスベクターは最小必須シス要素（すなわちLTRおよびパッケージングシグナル配列）およびタンパク質9.配列のみを含むことになり、E1（具体的にはE1aおよびE1b）およびE4領域を伴わず、付加的には、E3およびE2A領域およびウイルス構造遺伝子を伴わない可能性がある。組換えAAVベクターの場合、これらのベクターは、AAVウイルスRepタンパク質コーディング領域の欠失を含むことになるか、または、最小必須シス要素のみを含むことになる。後者は、E1a、E1b、E2AおよびE4遺伝子領域およびウイルス関連RNAをコードするDNAから、パッケージングについて欠損性であるものの野生型AAV遺伝子産物を供給する非パッケージング相補性AAVプラスミドを同時トランスフェクションすることによって生成される[Samulskiら、(1987)]。

## 【0032】

組換えアデノウイルス誘導またはAAV誘導ベクターは同様に、標的細胞内での選択されたトランスジーン産物の発現および産生を導くことができるという特徴とする。かくして、組換えベクターは、標的細胞の感染のため物理的構造および包膜にとって必須のアデノウイルスまたはAAVのDNA配列の全ての配列、並びに標的細胞内で発現されることになる選択されたトランスジーンを少なくとも含んでいる。

## 【0033】

このトランスジーンは、当該技術分野において周知の遺伝子移入技術方法を用いることによって標的細胞内にて発現した遺伝病または後天性疾患を改善する治療用遺伝子であってよい。1つの特定の局面においては、治療用遺伝子は、以下の表Iに示されている欠損性遺伝子に対応する正常なDNA配列、例えば、LDL受容体および $\alpha 1$ -アンチトリプシンに対応する正常なDNA配列である。もう1つの局面においては、トランスジーンは、サイトカイン遺伝子、自殺遺伝子、腫瘍抑制遺伝子または防御遺伝子、あるいは表IIに示されているリストから選択されたこれらの組合せをコードすることができる。サイトカイン遺伝子が選択された場合、標的細胞内の遺伝子の発現は、腫瘍の成長の抑制および/または腫瘍細胞の死滅を結果としてもたらす細胞免疫応答を刺激することによって悪性に対する治療を提供することができる。自殺細胞が選ばれた場合、遺伝子は腫瘍細胞内で発現された時点で、腫瘍細胞を特定の薬物の存在下で破壊することができるようにする。例えば、チミジンキナーゼ遺伝子は、腫瘍細胞内で発現された時点で、ガンシクロビルの存在下で腫瘍を破壊できるようにする。

## 【0034】

更にもう1つの実施態様においては、トランスジーンは、感染性疾患（表III参照）の予防のためのワクチンとして利用されるウイルス免疫原タンパク質をコードすることがで

きる。このようなワクチンの調製および投与方法は、当該技術分野において既知のものである（例えば、Estinら、Proc. Nat. Acad. Sci. 85; 1052(1988)参照）。

【0035】

本発明は更に、遺伝病および後天的疾患の治療法、ガン遺伝子治療および感染性疾患の予防のためのワクチンにも関する。トランスジーンは、組織特異的プロモーターの制御下で発現され得る。例えば、チロシナーゼプロモーターまたはチロシナーゼ関連タンパク質-1プロモーターの制御下で自殺遺伝子は、黒色腫についてのガン治療の場合においてメラノサイト内でのみ発現されることになる[Vile & Hart, Cancer Res. 53; 962-967(1993)およびLowingsら, Mol. Cell. Biol. 12; 3653-3663(1992)]。ex vivoおよびin vivoで標的細胞内へトランスジーンを担持するアデノウイルスまたはAAVベクターを導入するさまざまな方法がこれまでに記述されてきており、当該技術分野において周知のものである[例えば、Brody & Crystal, N.Y. Acad. Sci.会報716; 90-103, 1993]。本発明は、問題のトランスジーンを含有する組換えアデノウイルスまたはAAVベクターで標的細胞を感染させ、標的細胞内で選択されたトランスジーンを発現することによる治療方法、ワクチンおよびガン治療を提供する。

10

【0036】

例えば、本発明のトランスジーンを含む組換えアデノウイルスまたはAAVベクターのin vivo送達を、脳、肝臓、血管、筋肉、心臓、肺および皮膚を含む広範なさまざまな器官タイプに対しターゲティングさせることができる。本発明の組換えベクターを導入するための送達経路には、ほんのいくつかを挙げるだけでも、静脈内、筋肉、脈管内および経皮的注射がある（Brody & Crystalの論文中的表Iおよび引用参考文献も参照のこと）。

20

【0037】

ex vivo遺伝子移入の場合、標的細胞は宿主から除去され、本発明のAAVベクターおよび当該技術分野において周知の方法を用いて実験室内で遺伝的に修飾される[Walshら, PNAS89; 7257-7261], (1992)およびWalshら, Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 204; 289-300(1993)]。

【0038】

かくして、本発明の組換えアデノウイルスまたはAAVベクターは、上述の様式を含む従来の投与様式を用いて投与できるが、これらに制限されるわけではない。本発明の組換えアデノウイルスまたはAAVベクターは、液体溶液および懸濁液、微小嚢、リポゾームおよび注射可能なまたは輸注可能な溶液を含むが、これらに限られるわけではなく、さまざまな用量の形をしていてもよい。好ましい形状は、投与形態および治療的利用分野によって異なる。

30

【0039】

【表 1】

表 I  
遺伝性疾患のための遺伝子治療

疾病	欠失遺伝子	遺伝子産物	
家族性高コレステロール血症 (II型高脂血症)	LDL受容体	LDL受容体	10
家族性高リポ蛋白 リパーゼ欠損症 (I型高脂血症)	リポ蛋白 リパーゼ	リポ蛋白 リパーゼ	
フェニルケトン尿症	フェニルアラニンヒドロキシラーゼ	フェニルアラニンヒドロキシラーゼ	
尿サイクル欠損症	オルニチントランスカルバミラーゼ	オルニチントランスカルバミラーゼ	
von Gierke's病 (グリコーゲン貯蔵症、I型)	G6Pase	グルコース-6-ホスファターゼ	20
$\alpha$ 1-抗トリプシン欠損症	$\alpha$ 1-抗トリプシン	$\alpha$ 1-抗トリプシン	
膿疱性線維症	膿疱性線維症膜貫通 第VIII因子	膜塩素イオンチャネル 凝固第VIII因子	
von Willebrand病および 血友病A			
血友病B	第IX因子	凝固第IX因子	
鎌状赤血球貧血	$\beta$ グロビン	$\beta$ グロビン	
$\beta$ サラセミア	$\beta$ グロビン	$\beta$ グロビン	30
$\alpha$ サラセミア	$\alpha$ グロビン	$\alpha$ グロビン	
遺伝性球状赤血球症	スペクトリン	スペクトリン	
重篤な複合免疫欠損症	アデノシンデアミナーゼ	アデノシンデアミナーゼ	
Duchenne 筋ジストロフィー	ジストロフィンミニオン	ジストロフィン	
Lesch-Nyhan 症候群	ヒポキサンチンデアミナーゼ ホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT)	HGPRT	
Gaucher 病	$\beta$ -グルコセリダシターゼ	$\beta$ -グルコセリダシターゼ	40
Nieman-Pick 病	スフィンゴミエリナーゼ	スフィンゴミエリナーゼ	
Tay-Sachs 病	リソソーム 性ヘキサミニダーゼ	リソソーム 性ヘキサミニダーゼ	
メーロシロツ尿症	分枝ケト酸および ヒドロキシダーゼ	分枝ケト酸および ヒドロキシダーゼ	

【表 2】

表		II	
癌遺伝子治療			
サイトカイン遺伝子	自殺遺伝子	腫瘍抑制遺伝子	保護遺伝子
IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 顆粒球-マクロファージコロニー 刺激因子	チミジンキナーゼ、 シチジンジアミナーゼ ジフルリオキシン およびTNF	p53, Rb, およびWt-1	多剤耐性

10

【0041】

【表 3】

表		III	
感染症に対するワクチン			
感染症		ワクチン	
肝炎		HBV表面抗原	
HIV感染およびAIDS		HIVエンベロープタンパク質	
狂犬病		狂犬病糖タンパク質	

20

【実施例】

【0042】

以下の実施例は、本発明を例示する目的で示されるものであって、本発明の範囲をその他の形で制限することを意図したものではない。

#### 実施例 1

##### プラスミドの構築

この実施例では、293細胞の中へE4遺伝子領域を導入するのに用いられるプラスミドの構築について記述する。構築されたプラスミドを、図1に概略的に表わす。pIK6.1MMSVenponhe(Hpa)から誘導された親プラスミドpIK6.1MMSV-E4( $\Delta$ E4pro.)[Finerら, Blood 83: 43-50, (1994)]は、転写開始部位の上流15bpからE4ポリアデニル化部位の下流810bpまでのプロモーターなしのE4領域を含んでいる。E4遺伝子はモロニー Maus肉腫ウイルスU3断片に連結している。pIK6.1.MIP( $\alpha$ )-E4は、マウスのアルファインヒビンプロモーター[MIP( $\alpha$ )]のHindIII-XbaI PCR産物(Su. & Hsueh, BiochemおよびBiophys. Res. Common. 186: 293-300, 1992)の238bp断片と、pIK6.1MMSV-E4(E4pro.)の2.9kbのXbaI-StuI断片および3.9kbのStuI-HindIII断片の連結によって構築した。MIP( $\alpha$ )のPCRのために使用されるプライマは5'-g c g c a a g c t t c G G G A G T G G G A G A T A A G G C T C-3' (配列番号1)および5'-g g c c t c t a g a A G T T C A C T T G C C C T G A T G A C A-3' (配列番号2)であった。小文字で表わしたHindIII部位またはXbaI部位のいずれかを含む配列は、クローニング

40

50

を容易にするために存在している。クローニングされた $\alpha$ -インヒビンプロモーターは、配列の精確さを確認するために配列決定された。

#### 【0043】

組換えアデノウイルスを生成するのに使用されるプラスミドADV- $\beta$ -galを、図2に示すように構築した。出発プラスミドADV-1は、PCR IIの骨格上にヌクレオチド469-3326 (m.u. 1. 3~9. 24) からの欠失を伴うアデノウイルス5XhoIC断片 (m.u. 0~15. 8) の左末端を含んでいる (In Vitrogen, San Diego, CA)。欠失部位にはポリリンカーカセットを挿入した。アデノウイルス配列の左末端にある複数の制限部位を好都合に用いてプラスミドを直鎖状にすることができる。結果として得られるADV- $\beta$ -galプラスミドは、E1領域内のADV-1相容性部位SpeIおよびClaIの中にマウスのpgkプロモーターによって駆動されたE. coli  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子のBstBI-XbaI断片を挿入することによって構築され、これを後に、組換えウイルスを生成するのに使用した。

10

#### 実施例 2

##### 293-E4細胞系のトランスフェクションおよび選択

この実施例では、293-E4細胞系を樹立するために利用するトランスフェクションおよび選択プロセスについて記述する。American Type Culture Collection, ATCC#RL1573から得た293の細胞を、ダルベッコの修正イーグル培地 (DMEM)、1 g/Lのグルコース (JRH Biosciences)、10%の供与体仔ウシ血清 (Tissue Culture Biologics) の中で増殖させた。細胞をトランスフェクション実験の48時間前に10 cmの平板1枚につき $5 \times 10^5$ の割合で播種した。10  $\mu$ gのpIK-MIP ( $\alpha$ )-E4およびNeo<sup>r</sup>遺伝子を含む1  $\mu$ gのpGEM-pgkNeo-pgkpolyAをリン酸カルシウム共沈によって293細胞の中に同時トランスフェクションした [Wiglerら, Cell 57; 777-785 (1979)]。トランスフェクションを受けた細胞を、トランスフェクションの24時間後に標準培地の中で1:20に分裂させた。細胞を平板に固着させた後、培地を、1 mg/mlのG418 (Sigma, St. Louis, MO) を含む選択培地に交換した。約2~3週間の間、3日毎に新鮮な選択培地を細胞に再補給した。分離したクローンを取り出し、増殖させ、5~6継代の間、選択培地内に維持した。樹立された293-E4細胞系を日常的に標準培地内に維持した。

20

#### 実施例 3

##### サザン移入およびハイブリダイゼーション

293-E4細胞系からのゲノミックDNAを所望の制限酵素で消化させ、フェノール/クロロホルムで精製した。消化したDNA 10  $\mu$ gを0.8%~1%のアガロースゲル上に走らせ、ナイロン膜 (Zetabind, America Bioanalytical, Natick, MA) に移した。293-E4細胞系からのDNAを制限酵素で消化させ、分析した。野生型アデノウイルス5、pIK6、1MIP ( $\alpha$ )-E4プラスミドおよび親293細胞からのDNAも同様に同じ酵素で消化させ、対照として用いた。E4領域の制限断片、 $\alpha$ -インヒビンプロモーター配列およびE1領域を、適切な<sup>32</sup>P標識付けされたプローブに対するハイブリダイゼーションとそれに続くオートラジオグラフィによって検出した。

30

#### 実施例 4

##### ウイルス系統の調製

W162細胞をDMEM、4.5 g/Lのグルコースおよび10%のCSの中で増殖させた。W162細胞系は、アデノウイルスE4 DNAによって形質転換されたペロサル腎臓細胞系であり、E4欠失アデノウイルス変異体の増殖を支持する [Weinberg & Ketner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA80; 5383-5386 (1983)]。H5d11014ウイルスについては、Bridge & Ketner J. Virol 63; 631-638 (1989) の中で既に記述されている。このアデノウイルス5ウイルス菌株はE4領域内に2つの欠失を有し、W162細胞内でのみ増殖できる (Bridge & Ketner, 1989)。

40

#### 【0044】

H5d11014ウイルスの伝播および滴定をW162細胞上で行なった。本発明の293-E

50

4細胞系統からのH5d11014ウイルスの産生を評価するため、W162、293および293-E4細胞系を、6ウェルの平板内にウェル1つあたり $1 \times 10^5$ の割合で計数して平板固定し、細胞1個あたり50のプラーク形成単位(p.f.u.)の感染多重度(m.o.i)でH5d11014に感染させた。感染から48時間後に細胞を収集し、ウイルス系統を調製した。細胞を沈降させ、200 $\mu$ lの無血清培地内で再懸濁させた。細胞懸濁液を3回凍結サイクルに付し、解凍して細胞からウイルス粒子を放出させた。細胞破片を遠心分離によって廃棄した。感染を受けた細胞から産生されたウイルスの力価を、W162細胞の単層上のプラーク形成によって決定した。

#### 実施例 5

##### 組換えウイルスの構築

実験の48時間前に10cmの平板内に平板1枚あたり $2.5 \times 10^6$ の割合で293細胞系および293-E4細胞系を平板固定した。同時トランスフェクションの1時間前に、細胞に10mlの新鮮な培地を供給した。ClaIで消化された4 $\mu$ gのH5d1327(Thimmappayaら, Cell 31; 543-551 1982)と、BstBIにより直鎖状化された10 $\mu$ gのADV- $\beta$ -galの同時トランスフェクションによりAd5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal) $\Delta$ E3ウイルスを作成した。リン酸カルシウム沈降技術により293-E4細胞系上で、BstBIで直鎖状化したADV- $\beta$ -gal 10 $\mu$ gとClaIで消化したH5d11014 4 $\mu$ gを同時トランスフェクションすることによって、Ad5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal) $\Delta$ E4ウイルスを生成した。同時トランスフェクションの24時間後に、培地を除去し、培養の単層の上に、20mMのMgCl<sub>2</sub>、5%のCSおよび0.5%の不活性寒天(DIFCO Lab. Detroit, MI)を置いた。プラークを採取し、100 $\mu$ lのPBS中で再懸濁させた。

##### 【0045】

希釈したプラークサンプルを直ちに2~3回の青色プラーク精製に付した。青色プラーク精製は、プラークが現われた時点で1mg/mlのX-galを含む軟寒天の第2層を培養の上に置いた点を除いて、正規のプラーク検定の通りに行なった。2時間のインキュベーションの後、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を担持する組換えウイルスを含んでいたプラークは青色に染色された。組換えウイルスの純度を、白色プラークの無汚染によって決定した。精製したプラークを増殖させ、ライゼートのDNAを以前に記述されたように分析した(図6)[Graham & Prevec(1992)]。SmaIでアデノウイルスDNAを消化し、0.8%のアガロースゲル上で分画化した。CsCl勾配精製したウイルス系統から、H5d11014およびAd5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal) $\Delta$ E3ウイルスのDNAサンプルを抽出した。ウイルス感染した細胞から、Ad5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal) $\Delta$ E4のDNAを抽出した。

#### 実施例 6

##### 組織化学的染色

組換えウイルスAd5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal) $\Delta$ E3ウイルス(E1およびE3欠失ウイルス)およびAd5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal) $\Delta$ E4ウイルス(E1およびE4欠失ウイルス)を用いて、20m.o.iで(感染多重度20で)ウイルス感染を48時間行わせた後、細胞の単層をPBSで一度洗い、PBS中0.5%のグルタルアルデヒド(Sigma, St.Louis, MO)により室温で10分間固定する。細胞は1mM MgCl<sub>2</sub>を含むPBSで三度洗い、既述の方法に従って(Thimmappayaら, 1982)5-ブromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosidase(X-gal, Sigma)で染色した。ジメチルホルムアミド中の40mg/mlのX-galの溶液はKC溶液(5mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 5mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>・3H<sub>2</sub>Oを含むPBS)中1mg/mlに希釈した。2~4時間染色後、細胞をH<sub>2</sub>Oで洗い、光学顕微鏡で検鏡した。

#### 実施例 7

##### $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性アッセイ

細胞をAd5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal) $\Delta$ E3ウイルスおよびAd5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal) $\Delta$ E4ウイルスによって感染多重度20で感染し、酵素活性をMacGregorら, Somatic Cell Mol. Genetic. 13:253-264, (1987)によって述べられた方法に以下の改変を施して測定した。6ウェルプレート中の細胞をPBSで二度洗い、200 $\mu$ lの2 $\times$ Zバッファー(1 $\times$ Zバッファー:60mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

10

20

30

40

50

・7H<sub>2</sub>O、40mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・H<sub>2</sub>O、10mM KCl、1mM MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O) および200μlの0.2% Triton X-100を加えて溶解した。室温で5～10分インキュベーション後、各サンプルの100μlを96ウェルマイクロタイタープレートに移した。50μlの2-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド(2mg/ml)を加えた後、反応を室温で5分間進行させ、50μlの停止溶液(1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)を加えて停止させた。蛍光はマイクロタイタープレートリーダー(Molecular Devices Co. Menlo Park, CA)を用い、420nmで測定した。

#### 実施例 8

##### 293-E4細胞系の構築

Ad5 E4遺伝子領域を293細胞に導入する目的は、導入した細胞系が、二つの致死的な欠失(E1およびE4)を含む組換えアデノウイルスをパッケージすることができるからである。プラスミドpIK.MIP(α)-E4は、Ad5 E4領域の転写開始部位の上流15塩基対から、ポリアダニル化部位の下流810塩基対までの全長領域(図1)をもつ。E4遺伝子領域(m.u.88.9-98.8)はプロモーター領域の最初の159塩基対および5'非翻訳領域を含むマウスα-インヒビンプロモーターの238塩基対と直接に連結している。このプロモーター配列は基礎発現に必要とされる(Su & Hseuh(1992))。このプロモーター領域内にサイクリックアデノシン3', 5'-モノリン酸(cAMP)応答要素(CRE)があり、これはcAMPまたはアデニルシクラーゼ活性化因子によって誘導される、高レベルの遺伝子発現を可能にする(Paeiら, Mol. Endocrinol. 5:521-534(1991))。pIK.MIP(α)-E4はネオマイシン耐性遺伝子を持つpGEM-pgkNeo. pghpolyAとともに10:1に相当するモル比のリン酸カルシウム共沈によって293細胞に導入された。全部で66のG418耐性クローンをさらに解析するためにとりあげた。

#### 実施例 9

##### E4トランスフェクタントの同定

導入したアデノウイルスE4領域の組込みを調べるために、各クローンのゲノムDNAをHindIIIおよびSfiI、またはNcoI制限酵素で消化し、サザントランスファーで解析した。図3Aは導入したα-インヒビン-E4領域ならびにE4プローブ(Ad5のSmaI断片)およびインヒビンのプロモータープローブの対応する領域の制限マップを示す。全66中17クローンは、両方の消化のスクリーニングプロットにおいて全長のE4領域DNAの組込まれた場合に予想される正しいDNAパターンを示した。他のクローンは組込みを示さないか、あるいはE4領域のさまざまな長さの組込みを示した。図3B-3Eは最初のスクリーニングプロットにおいて全長の組込みをもつ17クローンおよび異なる長さのE4領域の組込みを含む2クローンから抽出したゲノムDNAのサザンプロットを示す。DNAは非選択的な培地中でこれらの細胞系を30回以上継代維持したのち抽出された。図3Bおよび3Cに示されるように、15の細胞系がHindIII/SfiI消化における特徴的な0.9kbおよび3.2kbの断片およびNcoI消化における1.6kbおよび2.1kbの断片を示す。スクリーニングプロットで他の15細胞系と同一の組込みパターンをもつ二つの細胞系(細胞系13および29)にはE4領域の配列が検出されなかった。このことは、これらの二細胞系に於ける組込みが不安定であることを示す。細胞系16および19は変化した制限パターンをもつE4遺伝子領域を保持する細胞系の例である。HindIII/SfiI消化における15細胞系すべての0.9kbバンドはマウスインヒビンプロモーター配列とハイブリッド形成を行う(図3D)。NcoI消化プロットに於いて、2.1kb断片とともに3.1kb断片はインヒビンプロモータープローブとハイブリッドを形成した。これらの結果はE4領域の遺伝子の全長がこれら15の細胞系に安定に組込まれたことを示している。これらの細胞系が生き残り、E4領域の全長を保持しているのはE1遺伝子領域を欠失したためである可能性を排除するため、プロットをAd5 HindIII E断片(m.u.7.7-17.1)によって再度検索した。19の細胞系のすべては、E1プローブによって検出される、親株の293細胞系における場合と同じ大きさの断片をもつ(図3e)。ゆえに、E1遺伝子は293-E4細胞系では変化していない。

#### 実施例 10

##### 293-E4細胞系の生物活性のスクリーン

これらの細胞系がE4欠失ウイルスの増殖を支持するかどうかをしらべるために、各細胞系をアデノウイルスE4欠失変異型ウイルスH5dl1014(Bridge & Ketner(1989))によって



感染させた。E4欠失株H5d11014はm.u.92から93.8およびm.u.96.4から98.4までの二つの欠失を含む。これら欠失はORF4を除きE4のあらゆるオープンリーディングフレームを破壊する。このウイルスはH2d1808およびH5d1366による感染を受けた細胞において見られるのと同様に、Hela細胞において、かなり少量のウイルスDNAおよび後期ウイルスタンパク質を生成する(Halbertら, J.Virol. 56:250-256(1985))。H5d11014の増殖を許す唯一の細胞系はW162である(Weinberg & Ketner(1983))。親の293細胞、W162細胞およびすべての15細胞系を1mMのcAMP添加または不添加のもとに感染多重度25でH5d11014により感染させると、感染後3～4日で6細胞系がW162細胞について観察されたものと、同程度の細胞毒性(CPE)を示した(図4)。CPEはW162および一部の293-E4細胞系の両方において、cAMPの存在下でよりすみやかに出現した。親の293細胞が示したCPEのレベルはより温和だった(図4)。この結果は、293-E4細胞系(E1およびE4遺伝子領域のいずれをも含む)は、E4遺伝子領域のみを含む細胞系(たとえばW162細胞系)と同程度に効率よくE4欠失ウイルス(たとえばH5d11014ウイルス)の増殖を支持する。

10

#### 実施例11

##### 293-E4細胞系におけるH5d11014生産の誘導

293-E4細胞系がH5d11014変異型ウイルスを生産する能力を定量的に試験し、かつ293-E4細胞系におけるE4遺伝子発現の特異的な誘導があるかを調べるために、cAMPの存在または非存在下における、293-E4細胞系から生産されるH5d11014の力価を測定した。ウイルスのストックは各細胞の同数を感染多重度50で、H5d11014により感染することによって調製した。感染の48時間後、各細胞系の上清をとり除き、細胞を最初の1/10の容量の無血清培地に再懸濁した。ウイルスストックの力価検定はW162細胞を用いたプラークアッセイによって行った。表1に示されるように、これら15細胞系からのウイルス生産の現象は、一般に三つのグループに分類される。細胞系8, 50および51を含むグループ1は293細胞によって得られる力価に比較して4から6桁高いウイルス力価の上昇を示した。細胞系8および51はcAMPの存在下、ウイルス力価の10倍の上昇を示した。細胞系12, 27および61を含むグループ2はW162細胞から得られるウイルス力価と同程度の力価を生み出した。ウイルス生産のレベルがcAMPの存在のもとに7桁増大した細胞系12を例外として、力価は1,000～10,000倍増大した。これらの結果は、これらの三つの細胞系中ではE4遺伝子発現が誘導されていることを示す。グループ3は、cAMPの存在下または非存在下で、ウイルスの力価が基本的に親の293細胞で生産されるものと類似のレベルである残りの細胞系を含む。このグループのいくつかの細胞系でもE4遺伝子発現の誘導が認められた。

20

30

細胞をcAMPによって処理するとW162および親の293細胞においても10倍の誘導が観察された。ウイルスの生産量におけるこの10倍増加は、これまたウイルスDNA合成の増大をひきおこすCREを含んでいる他のアデノウイルス初期遺伝子の発現に対するcAMPの増強効果(Leza & Hearing, J. Virol. 63:3057-3064(1989))によるものである可能性がある。

【0046】

【表 4】

表 IV

細胞系W162, 293および293-E4によって生産されるH5d11014の力価

グループ	細胞系	力 価 (pfu/ml) <sup>+</sup>	
		cAMP無添加	1mM cAMP
対 照	W162	2.2x10 <sup>10</sup>	1.2x10 <sup>10</sup>
	293	1.6x10 <sup>10</sup>	2.7x10 <sup>10</sup>
1	293-E4-8	8.9x10 <sup>10</sup>	3.3x10 <sup>10</sup>
	293-E4-50	6.7x10 <sup>10</sup>	4.5x10 <sup>10</sup>
	293-E4-51	8.9x10 <sup>10</sup>	2.2x10 <sup>10</sup>
2	293-E4-17	4.5x10 <sup>10</sup>	8.9x10 <sup>10</sup>
	293-E4-27	6.7x10 <sup>10</sup>	2.2x10 <sup>10</sup>
	293-E4-61	1.3x10 <sup>10</sup>	8.0x10 <sup>10</sup>
3	293-E4-6	1.1x10 <sup>10</sup>	8.9x10 <sup>10</sup>
	293-E4-15	1.3x10 <sup>10</sup>	6.7x10 <sup>10</sup>
	293-E4-33	6.7x10 <sup>10</sup>	1.6x10 <sup>10</sup>
	293-E4-34	6.7x10 <sup>10</sup>	1.3x10 <sup>10</sup>
	293-E4-35	1.3x10 <sup>10</sup>	1.1x10 <sup>10</sup>
	293-E4-48	6.7x10 <sup>10</sup>	6.7x10 <sup>10</sup>
	293-E4-52	1.8x10 <sup>10</sup>	1.3x10 <sup>10</sup>
	293-E4-59	3.3x10 <sup>10</sup>	6.7x10 <sup>10</sup>
	293-E4-62	1.6x10 <sup>10</sup>	6.7x10 <sup>10</sup>

† 力価はW162単層培養上のブランクアッセイによって決定した。  
 表中の数値は2つのサンプルによって測定された力価の平均  
 である。

## 実施例12

## Ad5/ΔE1 (β-gal) ΔE4ウイルスの作成

E1領域およびE4領域の両方に致死的な欠失をもつ組換えウイルスの救出のために、二つの最も効率のよい細胞系、細胞系8および細胞系61が用いられた。ADV-β-galプラスミドをBstB1によって直鎖化し、ClaIで消化したH5d11014と共に293-E4細胞系の単層に同時トランスフェクションした(図5)。組換えウイルスはADV-β-galとH5d11014の大型ClaI断

片(m.u.2.55-100)との重複するアデノウイルス配列の間のin vivo組換えによって生成した。トランスフェクション後7~10日に現れたプラークを単離し、青色プラークアッセイによって精製した。最終的に精製した青色プラークおよびウイルスDNAを分析した(図6)。以下の二重欠失組換えウイルスの比較研究のために、Ad5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal) $\Delta$ E3ウイルスを作成した。このウイルスはBstB1によって直鎖化したADV- $\beta$ -galプラスミドをClaIで消化したH5d1327(Thimmappayaら,(1982))と共に293細胞に同時トランスフェクトすることによって生じさせた(図5)。

#### 実施例13

##### Ad5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal) $\Delta$ E4ウイルスのin vitro評価

この二度目に生成した組換えウイルスの感染性を評価するために、感染性をHela, 293, W162および細胞系61の細胞中における二重致死欠失ウイルスおよび単一致死欠失ウイルスの $\beta$ -gal遺伝子の発現と比較した。これら二株の組換えウイルスにより、感染多重度20で48時間細胞を感染させた。両感染における発現を組織化学的染色および上述の $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性アッセイを共に用いて観察した。Ad5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal) $\Delta$ E4ウイルスの細胞障害作用の消失はプラークアッセイによって試験した。293-E4はこれら三株のウイルス(Ad5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal) $\Delta$ E4, Ad5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal) $\Delta$ E3およびH5d11014)のすべての増殖を許す唯一の細胞系である。293細胞はAd5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal) $\Delta$ E3ウイルスの増殖を許し、H5d11014ウイルスについては半許容的(低レベルのウイルス生産)であるが、Ad5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal) $\Delta$ E4ウイルスの増殖を許さない。W162細胞系はH5d11014ウイルスの増殖を許すが、Ad5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal) $\Delta$ E3ウイルスおよびAd5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal) $\Delta$ E4ウイルスの増殖を許さない。Hela細胞はウイルスの三株すべての増殖を許さない。これらの結果は、二重欠失ウイルスはテストしたヒト細胞系にはいかなる細胞障害作用をも持たなかったことを示している。二重欠失ウイルスの感染多重度20での感染後に細胞障害作用をもたなかったことは、これらのウイルスはin vivoでは後期遺伝子産物を発現しないことを示唆する。これは組換えウイルスに感染した細胞に対する免疫応答を排除し、これによってトランスジーンを発現を長期にわたらせる。

#### 実施例14

##### in vitroにおけるトランスジーンおよび末端切断型E4遺伝子の効率よい発現

Ad5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal) $\Delta$ E4によって媒介されるトランスジーン転写レベルでの発現を測定し、そしてAd5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal) $\Delta$ E4ウイルスからのE4の転写を物理的に視覚化するために、Ad5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal) $\Delta$ E4ウイルスRNAをノーザンブロットにより分析した。Hela細胞を組換えアデノウイルスにより細胞あたり20pfuで感染させた4、24および48時間後に全RNAを抽出した。H5d1327およびAd5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal)によって感染したHela細胞から抽出された全RNAを対照として用いた。RNAzol B試薬(Tel-Test, Inc. Friendswood, TX)を全RNAの抽出のために用いた。10 $\mu$ gの全RNAを1%の変性ゲルで電気泳動し、メンブレンフィルターに移行し、放射性のDNAプローブにハイブリッド形成させた。ノーザンブロットは放射性標識を行った $\beta$ -galの1.65kbのEcoRV-AccI断片、Ad5 E4領域の2.30kbのSmaI H断片(m.u.92.0-98.4)、L5領域の765塩基対のPCR断片、L3領域の1.45kbのSmaI断片(m.u.52.6-56.6)によって順次釣り上げた。アデノウイルスL5領域の増幅のためのPCRプライマーは5'-GAGCACTAAGGATTGATT-3'(NTs 31811-31828)(配列番号)および5'-CGTGAGATTTTGCATAAG-3'(NTs 32549-32566)(配列番号)であった。Ad5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal) $\Delta$ E4またはAd5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal)によって感染をうけた細胞は、感染後4時間で同じレベルの $\beta$ -gal mRNAを蓄積した(図7、パネルA)。しかし、Ad5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal) $\Delta$ E4の感染をうけた細胞は、Ad5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal)の感染をうけた細胞にくらべ、感染後24および48時間でより低レベルの $\beta$ -galを徐々に蓄積した。Ad5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal) $\Delta$ E4を介した $\beta$ -gal転写産物のレベルの若干の低下は、さきに述べた感染後24時間で検定した感染Hela細胞中の $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素活性の若干の低下と合致している。同一のプロットを、92.0から98.4m.u.までの長さをもち、L5領域の3'末端と重なり合わないアデノウイルスE4プローブ(Fraserら, J. Mol. Biol. 155:207-233(1982))で再ハイブリッド形成を行わせると、E4転写産物のレベルはAd5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal)感染細胞中で劇的に低下し

ている一方で、ポリソーム mRNA の特徴的なパターン (Tiggs ら, J. Virol. 50:106-117 (1984)) が H5d1327 および Ad5/ΔE1 (β-gal) によって感染されたサンプルに見られる。しかし、Ad5/ΔE1 (β-gal) ΔE4 によって感染をうけた細胞中では、1.5kb に相当する大きさの唯一の E4 転写産物しか存在しない (図 7、パネル B)。この観察はおそらく、ORF4 を除く E4 領域内のすべてのオープンリーディングフレームを破壊し、ORF4 タンパク質をコードする末端切断型の転写産物を生成させる、この E1/E4 欠失ベクター中の二つの大きな欠失によるものである。

この実施例は、Ad5/ΔE1 (β-gal) ΔE4 組換えアデノウイルスベクターによって運ばれるトランスジーンは有効に発現するという、実施例 13 で述べられた結果を支持する。

#### 実施例 15

in vitroにおけるアデノウイルス後期遺伝子の発現の低下または欠如

組換えアデノウイルスベクター Ad5/ΔE1 (β-gal) ΔE4 を生成させるために用いた親の変異型アデノウイルス H5d11014 は後期遺伝子の発現に重大な欠損があることが報告されている (Bridge and Ketner, J. Virol. 63:631-638, (1989))。Ad5/ΔE1 (β-gal) ΔE4 中の E1 および E4 領域の欠失の組合わせが後期遺伝子の発現の重大な欠陥または完全な阻害をもたらすかどうかを決定するために、増殖を支持しない HeLa 細胞中における Ad5/ΔE1 (β-gal) ΔE4 の後期 mRNA の蓄積をノーザンブロットおよび逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法によって測定した。ノーザンブロット (実施例 14 および図 7 で述べた) を、繊維タンパク質コード領域 (L5 領域) 内の NTs 31811 から 32566 までの Ad5 配列の PCR 産物である L5 プロンプ、およびヘキソントタンパク質のコード領域内の m.u. 52.6-56.6 の SmaII 断片である L3 プロンプに対して再ハイブリッド形成させた。E1-欠失ベクターを感染させた細胞中に、感染後 48 時間で L5 転写産物の低レベルの蓄積および検出しうるレベルの L3 mRNA が存在した (図 7、パネル C および D)。しかし、両後期転写産物は E1/E4-欠失アデノウイルスベクターによる感染をうけた細胞では検出されなかった。

#### 【0047】

アデノウイルス後期遺伝子転写産物が Ad5/ΔE1 (β-gal) ΔE4 組換えベクター中で発現しているかどうかを決定するために、本発明者らはより検出感度の高い RT-PCR 法を採用した。全 RNA を 1 単位/μg の RNase を含まない DNase (Promega Corp., Madison WI) により 37°C 60 分間処理した。cDNA の第一鎖は pd(N)<sub>6</sub> をプライマーとして (Pharmacia, Alameda CA) 合成した。同一セットの対照反応を逆転写酵素を抜いて行った。次いで両調製物 (RT<sup>+</sup> および RT<sup>-</sup>) をさきに述べた (実施例 14 参照) と同一の L5 プライマーを用いて増幅した。L3 領域に対するプライマーは 5'-CCTACGCACGAC-3' (配列番号 5) (NTs 18996-19007) ; 5'-TGTTTGGGTTAT-3' (配列番号 6) (NTs 20318-20329) である。増幅後、RT 産物は 1% アガロースゲル電気泳動にかけ、エチジウムブロミド染色によって可視化した。L5 mRNA は Ad5/ΔE1 (β-gal) および Ad5/ΔE1 (β-gal) ΔE4 による感染をうけた細胞の両方に同定された (図 8)。Ad5/ΔE1 (β-gal) ΔE4 による感染をうけた細胞では、L3 mRNA 転写産物は検出されなかった (図 8)。β-アクチンプライマーを用いた RT-PCR 反応を内部対照として用いた。RT-PCR に用いた β-アクチンプライマーは Fraser ら, J. Virol. 63, 631-638 (1989) に述べられているように、ラットおよびヒトの共通配列である。

#### 【0048】

ヘキソントタンパク質配列 (L3 領域内) の検出の感度を上げるために、RT-PCR 産物をさらにヘキソントタンパク質のコード領域の RT-PCR 産物の内部領域とハイブリッド形成するオリゴマー 5'-GACCGTGAGGATACT-3' (配列番号 7) をプロンプとしてサザンブロットによって解析した (図 9)。L3 転写産物は二重欠失をもつ Ad5/ΔE1 (β-gal) ΔE4 アデノウイルスベクターによる感染をうけた細胞中には検出されず、上述および図 8 に述べた研究の結果を確認するものである。これらの結果は、Ad5/ΔE1 (β-gal) ΔE4 ベクター中の E1 および E4 の欠失の組合わせが、アデノウイルスキャプシドタンパク質-ヘキソンをコードする L3 mRNA の完全な欠如をもたらすことを示している。

#### 実施例 16

in vivoにおけるトランスジーンの持続的発現

E1/E4欠失アデノウイルスベクターのアデノウイルス後期遺伝子発現の低下または欠如がトランスジーン発現を長引かせることができるかどうかを決定するために、E1欠失あるいはE1/E4欠失ベクターによる感染を受けた細胞における $\beta$ -gal遺伝子発現を検討した。以下のin vivo実験には二重欠失Ad5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal) $\Delta$ E4組換えウイルスおよびAd5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal)組換えウイルスを用いた。ウイルスストックは補償(complementing)パッケージング細胞の懸濁液から得、GrahamおよびPrevec, Methods Mol. Biol. 7:109-128, (1991)に述べられているように二度のCsCl遠心分離のバンド形成により精製した。用いたすべてのストックは、Lochmullerら, Hum. Gene Ther. 5:1485-1491, (1994)に述べられている、E1領域(NTs 13-1338)プライマーおよびE2領域(NTs 5053-5072)プライマーを用いたPCR分析によって測定して、E1含有ウイルスの混在はなかった。各組換えウイルス株による感染を受けた5匹の動物を感染後3, 7, 14, 21, 28, 35および77日目に殺した。さらに述べたX-galの組織化学的染色を上記感染動物の肝臓の凍結切片について実施した。染色は、E1欠失およびE1/E4欠失アデノウイルスベクターのいずれによる感染を受けた3および7日目の肝臓においても、ほぼ100%の組織が $\beta$ -ガラクトシダーゼを発現したことを示した。E1欠失ベクターによる感染を受けた肝臓では、14日(75~85%)から35日(15~25%)にかけてX-gal染色の急激な低下がみられた。77日目にはE1欠失のアデノウイルスによる感染を受けた動物において1~2%の肝臓のみが青く染色された。これとは対照的に、E1/E4欠失ウイルスによる感染を受けた肝臓では、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現は28日間にわたって85%というレベルが維持された。さらに77日目にはE1/E4欠失アデノウイルスの感染を受けた動物の肝臓のほぼ65-75%が $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を発現した。この実施例は、E1/E4二重欠失アデノウイルスベクター(アデノウイルス)におけるアデノウイルス後期遺伝子発現の欠如が、単一欠失のアデノウイルス、たとえばE1欠失アデノウイルスにくらべ、ウイルスベクター中に組み入れられたトランスジーン発現を著しく持続させることを実証している。

実施例17細胞障害作用の低下およびin vivoにおける宿主の免疫応答

E1/E4欠失アデノウイルスによる感染を受けた動物において、トランスジーン発現の延長と細胞障害作用の低下との間に逆相関があるかどうかを決定するために、各実験グループの5匹の動物から得られたランダムな肝臓のヘマトキシリン/エオシン(H&E)染色切片について検討した。凍結肝臓切片(6 $\mu$ m)を0.5%グルタルアルデヒド中で固定し、X-gal溶液で染色することにより $\beta$ -gal活性を染色した。形態学的な研究のためには、パラフィン肝臓切片をH&Eによって染色した。ランダム切片について検討した。細胞の膨満、組織の壊死、小葉構造(lobular structure)の減少および炎症性浸潤などの病理学的変化を、E1欠失アデノウイルスベクターによる感染を受けた動物において3日から7日にかけて観察し、さらに35日目まで続いた。77日目までには同じ感染を受けた動物のほとんどはこれらの形態学的な損傷から回復した。しかし、またE1/E4欠失アデノウイルスによる感染を受けた動物では、14日目を過ぎて軽微な炎症性浸潤が出現したことを除けば、3日から7日にかけては、上記の病理学的な変化のいずれも認められなかった。77日目までにはこの二重欠失ウイルスベクターによる感染を受けた動物のすべては、形態学的に正常へと回復した。この実施例は、細胞障害作用の低下は二重欠失のAd5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal) $\Delta$ E4組換えアデノウイルスベクターによって媒介されていることを示す。二重欠失アデノウイルスベクターによる感染を受けた動物におけるトランスジーン発現は、Ad5/ $\Delta$ E1( $\beta$ -gal)ベクターによる感染を受けた動物の肝臓に比較して、肝臓における組織再生活性が低下していることによるのかもしれない。

実施例18E4-ORF-6プラスミドの構築

この実施例はpIK6.1MIP( $\alpha$ )-ORF6プラスミドの構築を扱う。E4-ORF6領域の発現ベクターは図10に示されたように構築された。pIK6.1MMSVNhe(Finerら, Blood, 1994およびFinerら, 国際特許出願W0 94/29438中ではpIK6.1MMSVenpoNhe(Hpa)またはpkat1とも呼ばれ

10

20

30

40

50

る)に由来する親のpIK6.1MMSV-E4( $\Delta$ E4 pro.)はプロモーター領域を除くE4領域の全長の配列を含んでいる。pIK6.1MIP( $\alpha$ )-E4はマウスの $\alpha$ インヒビンプロモーター [MIP( $\alpha$ )] のHindIII-XbaI PCR産物の238bp断片をpIK6.1MMSV-E4( $\Delta$ E4 pro.)の2.9kbのXbaI-StuI断片および3.9kbのStuI-HindIII断片とライゲートすることによって構築した。pIK6.1MIP( $\alpha$ )-ORF6プラスミドはプロモーターのないE4領域をORF6断片のPCR産物によって置き換えることによって構築した。E4-ORF6のコード領域に対するPCRプライマーは5'-gccaatctaga GCTTCAGGAAATATGACT-3' (Ad5 NTs 34072から34089) (配列番号8) および5'-catctctcgagG GAGAAGTCCACGCCTAC-3' (Ad5 NTs 33179から33196まで) (配列番号9) である。小文字中のXhoI部位またはXbaI部位を含む配列はクローニングを容易にするために存在する。ORF6の転写はマウスのインヒビンプロモーターによって駆動され、またORF6領域の下流のプラスミド骨格上の異種ポリアデニル化シグナル(SV40 polA)が利用される。クローン化されたORF6 DNA断片は、この配列の正確さを確認するために配列決定した。pIK6.1MIP( $\alpha$ )-ORF6は以下に述べるようにパッケージング細胞系を作成するために用いた。

10

#### 実施例19

##### 293-ORF6細胞系の構築

以下の実施例は293-ORF6細胞系の構築について述べたものである。E4含有ウイルスを生成する潜在的可能性を排除するため、この新規なパッケージング細胞系は293細胞に最小不可欠なAd5 E4 ORF6コード領域を導入することによって確立したものである。プラスミドpIK.MIP( $\alpha$ )-ORF6は、ゲノムの右端から番号をつけて、ヌクレオチド1846から2756にかけての、Ad5 E4-ORF6のコード領域の910bpのPCR断片を含む。ORF6領域はさきに述べたようにマウス $\alpha$ インヒビンプロモーター領域の下流にクローニングされた。pIK6.1MIP( $\alpha$ )-ORF6は293細胞中に、Neor遺伝子を含むプラスミドと共に同時トランスフェクトされた。54のG418耐性クローンを単離し、増殖させ、サザンブロットによってE4-ORF6配列の組込みについてスクリーニングを行った(図11)。各クローンからのゲノムDNAをHindIIIおよびXmnIで消化し、ORF6のPCR断片とハイブリッド形成を行った(図11、パネルA)。合計54のスクリーニングを行ったクローン中、8クローンが無傷のORF6領域について予想される1.7kb断片の少なくとも1コピーを保持していた。ブロットをAd5 HindIII E断片(m.u. 7.7-17.1)であるE1プローブと再ハイブリッド形成させた(図11、パネルB)。8つの293-ORF6細胞系のすべてはE1プローブによって検出される、親の293細胞中に存在するのと同じの大きさの断片を示した(図11)。この実施例はE1遺伝子の構造がこの細胞系中で変化していないことを示している。上記の細胞系は無傷のE1遺伝子を持つだけでなく、また少なくとも1コピーのE4 ORF6領域を保持する。

20

30

#### 実施例20

##### 293-ORF6細胞系によるE4機能の補足

293-ORF6細胞系をE4-欠失変異型アデノウイルス、H5d11014による感染にひきつづくウイルス産生の能力についてスクリーニングを行った。H5d11014アデノウイルスはORF4を除きE4領域のすべてのオープンリーディングフレームを破壊し、Hela細胞中のウイルスDNAおよび後期ウイルスタンパク質の生産の大幅な低下を招く、二つの欠失をもつ。無傷のE4領域を含むW162細胞系は、H5d11014の増殖を支持する細胞系である [Bridge and Ketner, J. Virol. 63:631-638, (1989)]。親の293, W162, 293-E4および293-ORF6細胞をH5d11014により感染多重度25pfuで感染させると、8つの293-ORF6細胞系のすべては、感染後3~4日で、W162細胞および293-E4細胞について観察されるのと同様な細胞障害作用(CPE)を示した。H5d11014の産生の定量的な分析は、293-ORF6および対照細胞系の単層上の限界希釈によるブランクアッセイによって行った。293-ORF6によって産生されるH5d11014の力価は、W162および293-E4細胞の双方によって産生されるのと同様の範囲にあった(表V)。

40

【表 5】

表 V

## 補足生物活性でみたE4-ORF6細胞系の性質

細胞系	力価 (pfu/ml) <sup>c</sup>		
	d11014 <sup>a</sup>	d1312 <sup>b</sup>	ΔE1/ΔE4 <sup>b</sup>
W162	$5.0 \times 10^7$	0	0
293	0	$2.2 \times 10^{10}$	0
293-E4	$6.0 \times 10^6$	$1.8 \times 10^{10}$	$2.0 \times 10^6$
ORF6-34	$6.0 \times 10^7$	$6.0 \times 10^{10}$	$5.0 \times 10^6$

<sup>a</sup> 細胞系から産生されたH5d11014ライセート (lysate) の力価はW162単層培養上のプラークアッセイによって定量した。

<sup>b</sup> H5d312ストックおよびdE1/dE4ストックの力価は細胞系を用いて定量した。

<sup>c</sup> 表中の数値は2通りのサンプルで測定した力価の平均であった。

## 【0050】

したがって、E4遺伝子領域の小さな必須DNA断片を含むにすぎない293-ORF6細胞系は、E4機能を補足するのに十分であり、E4欠失変異型ウイルスの増殖を支持する。

## 実施例21

## 293-ORF6細胞系によるE1機能の補足

サザン解析は試験を行った293-ORF6細胞系のすべてが無傷のE1領域のコピーを含むことを示した。この細胞系のE1機能を補足する生物活性について検定した (表Vに示されるような補足活性アッセイ)。W162, 293, 293-E4および293-ORF6 #34細胞系の単層を、E1-欠失変異型ウイルス、H5d1312によって感染させ、ウイルス産生を限界希釈プラークアッセイにより定量した。8つの293-ORF6細胞系の各々は親の293細胞で産生されるのと同様のレベルのE1-欠失ウイルスを産生した (表V)。したがって、293-ORF6細胞系はE1およびE4遺伝子産物機能のいずれをも補足する能力を有する。

## 実施例22

## 293-ORF6細胞系によるE1およびE4両機能の同時的補足

この実施例は、293-ORF6細胞系がE1およびE4の両領域に欠失をもつ組換えウイルスを救済する能力をもつことを述べたものである。細胞系34はH5d11014の最も高い力価を与えた二つの細胞系、すなわち細胞系21および34から、さらにテストを行うために選ばれた。さきに述べたように構築されたE1/E4二重欠失組換えウイルス、Ad5/ΔE1 (β-gal) ΔE4は、pgkプロモーターの制御下にある大腸菌のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子を含む。Ad5/ΔE1 (β-gal) ΔE4はさきに述べたようにH5d11014を親ウイルスとして用い、組換えによって生じさせた。Ad5/ΔE1 (β-gal) ΔE4の産生の定量的な分析は、対照細胞系および293-ORF6-34細胞系の単層上の限界希釈によるプラークアッセイによって実施した。X-gal染色により青く染色されるプラークは293-E4および293-ORF6-34の単層上に感染後7~10日で出現した。293-ORF6-34細胞系から産生するAd5/ΔE1 (β-gal) ΔE4の力価は293-E4細胞系から産生する力価と同じであった。この実施例は293-ORF6-34細胞系がE1とE4の二つの致死欠失をもつウイルスの増殖を支持することを示す。実施例19で述べた新規なパッケージング細胞系は、それらが高い力価のウイルスを産生し、またトランスフェクトした細胞系内に存在するベクター中のE4欠失とE4-ORF6を発現するプラスミドとの間に重複がないことから複製能力のあるアデノウイルス(RCA)を産生できないので、E1/E4-欠失組換えアデノウイルスの増殖には有利である。

### 実施例23

#### E2A プラスミドの構築

pIK6.1MIP( $\alpha$ )-E2A プラスミドは既述のようにpIK6.1MIP( $\alpha$ )-E4から構築した。プロモーターをもたないE4遺伝子を第二のリーダー配列を残した状態で21562から24627 (m.u.59.9から68.3) [Klessigら, Mol. Cell. Biol. 4:1354-1362, (1984)] までのAd5 E2A遺伝子で置き換えた。Ad5 E2A遺伝子はアデノウイルスDNA結合タンパク質(DBP)をコードし、アデノウイルスDNA複製に必要である [Van der Vliet and Sussenbach, Virology, 67:415-426(1975)]。自身のプロモーターおよび第一のリーダー配列を欠く遺伝子(m.u.61.5-68)をマウスの $\alpha$ インヒビンプロモーター領域の下流にクローニングした。m.u.65.2から68.3までのPCR産物をプライマー5'-tccatttctagaTCGGCTGCCGTTG-3' (配列番号10) (Ad5 NTs 24615から24627)および5'-ACGTGCTACTTGTCCATC-3' (配列番号11) (Ad5 NTs 23443から23460)を用いて得た。小文字のXbaI部位を含む配列が存在するのはライゲーションおよびクローニングを容易にするためである。PCR産物をXbaIおよびPvuIの両方で消化し、NTs 21562から23501 (m.u.59.9から65.2) までのAd5のBamHIおよびPvuI DNA断片とライゲートさせた。次いでプロモーターを欠くE2A DNA配列を用いてpIK6.1MIP( $\alpha$ )-E4プラスミドのプロモーターを欠くE4領域を置換した。クローン化したE2A遺伝子の転写はマウス $\alpha$ インヒビンプロモーターによって駆動され、またE2A領域の下流にあるプラスミド骨格上の異種のポリアデニル化シグナル(SV40 polA)が利用される。クローン化されたE2A遺伝子は配列決定を行い、配列の正確さを確認した。pIK6.1MIP( $\alpha$ )-E2Aプラスミドを用いて以下に述べるようにパッケージング細胞系を作成した。

### 実施例24

#### 293-E2A 細胞系の構築

以下の実施例は293-E2A細胞系の構築について述べる。E1およびE2A両遺伝子機能を同時にトランスで補足する能力をもつパッケージング細胞系を構築するために、プラスミドpIK6.1MIP( $\alpha$ )-E2AをNeo<sup>r</sup>遺伝子を含むプラスミドと共に293細胞にトランスフェクトした。293細胞(ATCC CRL1573)はダルベッコ改良イーグル培地(DMEM)、1 g/l グルコース(JRH Biosciences, Denver, PA)、10%ドナーウシ血清(Tissue Culture Biologics, Tulare, CA)で培養した。細胞はトランスフェクションの48時間前に10cmのプレートあたり $5 \times 10^5$ 個をまいた。10mgのpIK6.1MIP( $\alpha$ )-ORF6およびマウスホスホグリセレートキナーゼプロモーターの制御下にあるネオマイシン耐性遺伝子をコードするpGEM-pgk Neo. pgk polyAの1 mgをリン酸カルシウム共沈により、293細胞に同時トランスフェクトした [Wiglerら, Cell 16:777-785, (1979)]。

#### 【0051】

50のG418耐性クローンを単離し、増殖させ、サザンブロットによりE2A配列の組込みについてスクリーニングを行った。各クローンからのゲノムDNAはXbaIおよびAflIIIにより消化し、E2Aプローブに対しハイブリッド形成させた。スクリーンした全50クローン中12が無傷のE2A領域に対して予想される1.44kb断片の少なくとも1コピーを保持した。ブロットはE1プローブ(m.u.7.7から17.1のAd5 HindIII断片)によって再度検索した。12のすべての293-E2A細胞系は親の293細胞と同一の大きさの断片を持つ。この実施例はE1遺伝子の構造はこれらの細胞系で変化しておらず、また細胞系が少なくとも1コピーのE2A遺伝子をもつことを示す。

### 実施例25

#### 293-E4/E2A細胞系の構築

以下の実施例は293-E4/E2A細胞系の構造について述べる。E1、E2AおよびE4遺伝子機能を同時にトランスで補足する能力をもつパッケージング細胞系を構築するために、プラスミドpIK6.1MIP( $\alpha$ )-E2AをNeo<sup>r</sup>遺伝子を含むプラスミドと共に293-E4細胞に同時トランスフェクトした。293-E4細胞はダルベッコ改良イーグル培地(DMEM)、1 g/l グルコース(JRH Biosciences, Denver, PA)、10%ドナーウシ血清(Tissue Culture Biologics, Tulare CA)で培養した。細胞はトランスフェクションの48時間前に10cmのプレートあたり $5 \times 10^5$ 個をまいた。10mgのpIK6.1MIP( $\alpha$ )-PRF6およびマウスホスホグリセレートキナーゼプロモ



ーターの制御下にあるネオマイシン耐性遺伝子をコードする、pGEM-pgk Neo.pgk polyAの1 mgをリン酸カルシウム共沈により293細胞に同時トランスフェクトした(Wiglerら, 1979)。50のG418耐性クローンを単離し、増殖させ、サザンブロットによりE2A配列の組込みについてスクリーニングを行った。各クローンからのゲノムDNAはXbaIおよびAflIIIにより消化し、E2Aプローブに対しハイブリッド形成させた。スクリーンした全50クローン中21が無傷のE2A領域に対し予想される1.44kb断片の少なくとも1コピーを保持した。ブロットはE1プローブ(m.u.7.7から17.1までのAd5 HindIII E断片およびE4プローブ(m.u.92から98.4までのSmaI H断片)で再プローブを行った。21のすべての293-E2A細胞系は親の293-E4細胞系と同一の組込んだE1およびE4 DNAのパターンを示した。この実施例はE1およびE4遺伝子の構造はこれらの細胞系で変化しておらず、さらにまたこれらの細胞系のすべてに1コピーのE2A遺伝子が保持されていることを示す。

10

#### 実施例 26

##### ウイルス関連RNA (VARNA) プラスミドの構築

この実施例はpIK6.1-VARNAプラスミドの構築について述べる。pIK6.1-VARNAプラスミドはFinerらによってW0 94/29438中で述べられたpIK6.1から誘導された。m.u.29から30.1までの、RNAポリメラーゼIIIに対する内在性のプロモーターとともにAd5 VARNA1およびVARNA2遺伝子を含むPCR産物をpIK6.1プラスミドにクローン化した。PCR産物はプライマー、5'-tactaacctaggACGCGCTCCAGATGTTG-3' (Ad5 NTs 10504から10521) (配列番号12) および5'-tactaacactacCCGCTGCTCTTGCTCTTG-3' (Ad5 NTs 11095から11112) (配列番号13) を用いて得た。小文字部分のAvrIIまたはDraIII部位を含む配列はクローニングを容易にするために存在させた(図13)。クローン化されたウイルス関連RNA遺伝子は配列決定を行い配列の正確さを確認した。

20

本明細書に引用されたすべての刊行物は、それぞれの刊行物が参考として組み込むために特定のかつ個別的に示されたかのように、全体が参考としてここに組み入れられる。

#### 【0052】

本発明に関連する分野の専門家には明らかなように、本発明は本発明の精神または本質的な性格から逸脱することなしに、これまでに特定の開示した以外の形態で具体化することができる。したがって、上に述べた本発明の特定の具体化例は、説明のためのものであって限定するものではないと考えるべきである。

30

#### 【0053】

本発明の範囲はこれまでの記述に含まれている実施例に限られるのではなく、むしろ添付の請求の範囲で明らかにされている。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0054】

【図1】図1は、以下の実施例1に記述した通りのpIK6.1MIP( $\alpha$ )-E4プラスミドの構築を示す。

【図2】図2は、以下の実施例1に記述した通りのADV- $\beta$ -galプラスミドの構築を示す。

【図3A】図3Aは、以下の実施例3で記述される通りの293-E4細胞系の例示およびサザン分析である。導入されたMIP( $\alpha$ )-E4の制限パターンおよびサザンブロットで使用されるプローブがこの例示において示されている。実線の矢印は、マウス $\alpha$ -インヒビンプロモーター領域を表わす。白抜きのバーはE4領域の全長を表わす。マウスインヒビンプローブは、実施例1で記述されている283bpのPCR産物である。E4プローブはSmaIH断片(m.u.92~98.4)である。制限酵素部位は、以下のように略記される：HはHindIIIを示し；SはSfiIを示し；NはNcoIを示す。

40

【図3B】図3Bは、以下の実施例3で記述される通りの293-E4細胞系の例示およびサザン分析である。DNAはHindIIIおよびSfiIで消化され、E4プローブにハイブリッド形成された。

【図3C】図3Cは、以下の実施例3で記述される通りの293-E4細胞系の例示およびサザン分析である。DNAはNcoIで消化され、E4プローブにハイブリッド形成された

50

。【図3D】図3Dは、以下の実施例3で記述される通りの293-E4細胞系の例示およびサザン分析である。E4プロローブは、HindIIIおよびSfiI消化プロットから剥ぎ取られ、DNAはインヒビンプロモータープロローブで再度プロローブ探査された。

【図3E】図3Eは、以下の実施例3で記述される通りの293-E4細胞系の例示およびサザン分析である。インヒビンプロローブはHindIIIおよびSfiI消化プロットから洗い流され、DNAは、m.u.7.7~m.u.17.1のHindIII E断片であるE1プロローブで再度プロローブ探査された。

【図4A-B】図4A-Jは、以下の実施例10で記述される通り、cAMPの存在下または不在下でのW162、293および293-E4細胞系に対するH5d11014の細胞変性効果を示す写真である。親293細胞はパネルA-D内に表わされている；293-E4細胞はパネルE-Gに表わされ、W162細胞はパネルH-J内に表わされている。感染していない細胞はパネルA、EおよびHの中に示されている。cAMPの添加なしでH5d11014の感染を受けた細胞は、パネルC、FおよびIに示され、1mMのcAMP添加を伴うH5d11014の感染を受けた細胞は、パネルD、GおよびJに示されている。パネルBは、擬似感染および1mMのcAMP添加を伴う293細胞を表わす。

10

【図4C-D】図4A-Jは、以下の実施例10で記述される通り、cAMPの存在下または不在下でのW162、293および293-E4細胞系に対するH5d11014の細胞変性効果を示す写真である。親293細胞はパネルA-D内に表わされている；293-E4細胞はパネルE-Gに表わされ、W162細胞はパネルH-J内に表わされている。感染していない細胞はパネルA、EおよびHの中に示されている。cAMPの添加なしでH5d11014の感染を受けた細胞は、パネルC、FおよびIに示され、1mMのcAMP添加を伴うH5d11014の感染を受けた細胞は、パネルD、GおよびJに示されている。パネルBは、擬似感染および1mMのcAMP添加を伴う293細胞を表わす。

20

【図4E-F】図4A-Jは、以下の実施例10で記述される通り、cAMPの存在下または不在下でのW162、293および293-E4細胞系に対するH5d11014の細胞変性効果を示す写真である。親293細胞はパネルA-D内に表わされている；293-E4細胞はパネルE-Gに表わされ、W162細胞はパネルH-J内に表わされている。感染していない細胞はパネルA、EおよびHの中に示されている。cAMPの添加なしでH5d11014の感染を受けた細胞は、パネルC、FおよびIに示され、1mMのcAMP添加を伴うH5d11014の感染を受けた細胞は、パネルD、GおよびJに示されている。パネルBは、擬似感染および1mMのcAMP添加を伴う293細胞を表わす。

30

【図4G-H】図4A-Jは、以下の実施例10で記述される通り、cAMPの存在下または不在下でのW162、293および293-E4細胞系に対するH5d11014の細胞変性効果を示す写真である。親293細胞はパネルA-D内に表わされている；293-E4細胞はパネルE-Gに表わされ、W162細胞はパネルH-J内に表わされている。感染していない細胞はパネルA、EおよびHの中に示されている。cAMPの添加なしでH5d11014の感染を受けた細胞は、パネルC、FおよびIに示され、1mMのcAMP添加を伴うH5d11014の感染を受けた細胞は、パネルD、GおよびJに示されている。パネルBは、擬似感染および1mMのcAMP添加を伴う293細胞を表わす。

40

【図4I-J】図4A-Jは、以下の実施例10で記述される通り、cAMPの存在下または不在下でのW162、293および293-E4細胞系に対するH5d11014の細胞変性効果を示す写真である。親293細胞はパネルA-D内に表わされている；293-E4細胞はパネルE-Gに表わされ、W162細胞はパネルH-J内に表わされている。感染していない細胞はパネルA、EおよびHの中に示されている。cAMPの添加なしでH5d11014の感染を受けた細胞は、パネルC、FおよびIに示され、1mMのcAMP添加を伴うH5d11014の感染を受けた細胞は、パネルD、GおよびJに示されている。パネルBは、擬似感染および1mMのcAMP添加を伴う293細胞を表わす。

【図5】図5は、以下の実施例5で記述する通りの組換えウイルスAd5/ΔE1(β-gal)ΔE4およびAd5/ΔEa(β-gal)ΔE3の構築および構造を表わして

50

いる。

【図6】図6は、以下の実施例5で記述する通りの組換えウイルスの制限酵素分析を例示する。

【図7A-B】図7A-Dは、組換えアデノウイルスベクターでの感染を受けたHeLa細胞内の転写産物のノーザン分析を表わす。全RNAは、感染後4、24および48時間で分離された。パネルAは、32Pで標識付けされた $\beta$ -gal DNAプローブに対するハイブリッド形成によって同定された転写産物である。パネルBは、Ad5E4プローブでハイブリッド形成された転写産物である。パネルCは、Ad5L3領域DNAプローブに対しハイブリッド形成させることによって検出された転写産物である。パネルDは、放射性標識付けされたL5領域PCR産物でプローブ探査された転写産物である。

10

【図7C-D】図7A-Dは、組換えアデノウイルスベクターでの感染を受けたHeLa細胞内の転写産物のノーザン分析を表わす。全RNAは、感染後4、24および48時間で分離された。パネルAは、32Pで標識付けされた $\beta$ -gal DNAプローブに対するハイブリッド形成によって同定された転写産物である。パネルBは、Ad5E4プローブでハイブリッド形成された転写産物である。パネルCは、Ad5L3領域DNAプローブに対しハイブリッド形成させることによって検出された転写産物である。パネルDは、放射性標識付けされたL5領域PCR産物でプローブ探査された転写産物である。

【図8】図8は、以下の実施例15で記述された通りのRT-PCR産物の臭化エチジウムで染色されたアガロースゲルを表わす。

【図9】図9は、L3逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)産物のサザンブロット分析を表わす。+RT反応混合物からのRT産物をアガロースゲルにかけ、ナイロン膜に移し、次にL3RT-PCR産物の内部配列に対しハイブリッド形成する、末端標識付けされたオリゴマーでプローブ探査した。

20

【図10】図10は、以下の実施例18に記述された通りのORF-6E4プラスミドの構築を例示する。

【図11A】図11Aは、pIK6.1MIP( $\alpha$ )-ORF6プラスミドの概略的制限パターンである。プラスミドpIK6.1MIP( $\alpha$ )-ORF6は、マウス $\alpha$ インヒビンプロモーターの制御下にあるウイルスゲノムの右端から1876~2756のヌクレオチド配列からのアデノウイルス5E4-ORF6コーディング配列の910bpのPCR産物を含有している。白抜き矢印は、マウス $\alpha$ インヒビンプロモーター領域を表わす。斜線入りのバーはORF6コーディング領域を表わす。ORF6プローブはPCR産物である。制限酵素部位は次のように略記される；HはHindIIIであり；XはXmnIである。

30

【図11B】図11Bは、ORF6プローブで探査された293-ORF6細胞系のサザンブロットを表わす(下の写真)。同じブロットは、m.u.7.7~m.u.17.1のHindIII断片であるE1プローブ(上の写真)で再度ハイブリッド形成された。

【図12】図12は、pIK6.1MIP( $\alpha$ )-E2Aプラスミドの構築を例示している。

【図13】図13は、ウイルス関連RNA遺伝子領域を転写するDNA配列を含むプラスミドの構築を示している。

【0055】

40

## 配列表

## (1) 一般的情報

(i) 出願人：ワン, クィン

ファイナー, ミッチェル エイチ.

ジア, ザオーチ

10

(ii) 発明の名称：新規アデノウイルスベクター、パッケージング細胞系、組換えアデノウイルス、および方法

(iii) 配列の数：13

(iv) 住 所：

(A) 名宛人：セル ジェネシス, インク.

(B) 通り名：レイクサイドドライブ322

20

(C) 市名：フォスター市

(D) 州名：カリフォルニア

(E) 国名：アメリカ合衆国

(F) 郵便番号：94404

(v) コンピューター読取り可能形式：

(A) 媒体の型：フロッピーディスク

30

(B) コンピューター：IBM PC互換機

(C) オペレーティングシステム：PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア：PatentIn リリース#1.0, バージョン#1.25

(vi) 本出願のデータ：

(A) 出願番号 :

(B) 出願日 : 1995年11月03日

(C) 分類 :

(viii) 代理人の情報 :

(A) 代理人名 : クルペン, カレン アイ.

(B) 登録番号 : 34, 647

(C) 参照/事件番号 : CELL 16.3.

10

(ix) テレコミュニケーションの情報 :

(A) 電話番号 : (415) 358-9600 X131

(B) テレファックス : (415) 349-3792

(2) 配列番号 : 1 :

20

(i) 配列の特色

(A) 配列の長さ : 31塩基

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : DNA (genomic)

30

(xi) 配列 :

GCGCAAGCTT CGGGAGTGGG AGATAAGGCT C

## (2) 配列番号 : 2 :

## (i) 配列の特色

(A) 配列の長さ : 31 塩基

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

10

(ii) 配列の種類 : DNA (genomic)

(xi) 配列 :

GGCCTCTAGA AGTTCACCTG CCCTGATGAC A

31

## (2) 配列番号 : 3 :

## (i) 配列の特色

20

(A) 配列の長さ : 18 塩基

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : DNA (genomic)

(xi) 配列 :

30

GAGGACTAAG GATTGATT

18

## (2) 配列番号 : 4 :

## (i) 配列の特色

(A) 配列の長さ : 18 塩基

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

10

(D) トポロジー : 直鎖状

## (ii) 配列の種類 : DNA (genomic)

## (xi) 配列 :

**CGTGAGATTT TGGATAAG****18**

20

## (2) 配列番号 : 5 :

## (i) 配列の特色

(A) 配列の長さ : 12 塩基

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

30

(D) トポロジー : 直鎖状

## (ii) 配列の種類 : DNA (genomic)

(xi) 配列：

CCTACGCACG AC

12

(2) 配列番号：6：

(i) 配列の特色

10

(A) 配列の長さ：12塩基

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

20

(xi) 配列：

TGTTTGGGTT AT

12

(2) 配列番号：7：

30

(i) 配列の特色

(A) 配列の長さ：15塩基

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

40



(xi) 配列 : ...

**GACCGTGAGG ATACT**

**15**

(2) 配列番号 : 8 :

10

(i) 配列の特色

(A) 配列の長さ : 29 塩基

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : DNA (genomic )

20

(xi) 配列 :

**GCCAATCTAG AGCTTCAGGA AATATGACT**

**29**

(2) 配列番号 : 9 :

30

(i) 配列の特色

(A) 配列の長さ : 29 塩基

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : DNA (genomic)

(xi) 配列 :

CATCTCTCGA GGGAGAAGTC CACGCCTAC  
29

10

(2) 配列番号 : 10 :

(i) 配列の特色

(A) 配列の長さ : 25 塩基

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

20

(ii) 配列の種類 : DNA (genomic)

(xi) 配列 :

TCCATTTCTA GATCGGCTGC GGTTC  
25

30

(2) 配列番号 : 11 :

(i) 配列の特色

(A) 配列の長さ : 18 塩基

(B) 配列の型 : 核酸

40

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(xi) 配列：

10

ACGTGGTACT TGTCCATC

18

(2) 配列番号：12：

(i) 配列の特色

20

(A) 配列の長さ：30塩基

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

30

(xi) 配列：

TACTAACACT ACCCGCTGCT CTTGCTCTTG

30

(2) 配列番号：13：

40

## (i) 配列の特色

(A) 配列の長さ : 30塩基

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : DNA (genomic)

10

## (xi) 配列 :

TACTAACCTA GGACGCGGTC CCAGATGTTG

30

【0056】

20

国際出願番号 : PCT/

微 生 物	
頁 行に記載した微生物に関する任意のシート	
A. 寄託物の表示	
他の寄託物は別のシートに表示する	
寄託機関の名称	
アメリカン タイプ カルチャー コレクション	
寄託機関のあて名	
アメリカ合衆国 20852 メリーランド州, ロックビル, パークローン ドライブ 12301	
寄託日	受託番号
1994年8月30日	CRL 11711

30

40

PCT/RO/134 (1981年)

国際出願番号：PCT／

PCT／RO／134 （続き）

アメリカン タイプ カルチャー コレクション

アメリカ合衆国 メリーランド州，ロックビル

パークローン ドライブ 12301

10

受託番号

寄託日

75879

1994年 8月30日

1995年10月25日

1995年10月25日

1995年10月25日

20

【0057】

30



# American Type Culture Collection

12301 Parklawn Drive • Rockville, MD 20852 USA • Telephone: (301)231-5520 Telex: 898-035 ATCCNORTH • FAX: 301-770-2587

## BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

### INTERNATIONAL FORM

#### RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3 AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2

10

To: (Name and Address of Depositor or Attorney)

Cell Genesys, Inc.  
Attention: Qing Wang  
322 Lakeside Drive  
Foster City, CA 94404

Deposited on Behalf of: Cell Genesys, Inc.

Identification Reference by Depositor:

ATCC Designation

20

Human Cell Line, 293-ORF6

CRL 11990

The deposit was accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic description indicated above.

The deposit was received October 25, 1995 by this International Depository Authority and has been accepted.

#### AT YOUR REQUEST:

☒ We will inform you of requests for the strain for 30 years.

The strain will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the strain and ATCC is instructed by the United States Patent & Trademark Office or the depositor to release said strain.

30

If the culture should die or be destroyed during the effective term of the deposit, it shall be your responsibility to replace it with living culture of the same.


The strain will be maintained for a period of at least 30 years after the date of deposit, and for a period of at least five years after the most recent request for a sample. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

The viability of the culture cited above was tested November 7, 1995. On that date, the culture was viable.

International Depository Authority: American Type Culture Collection, Rockville, Md. 20852 USA

40

Signature of person having authority to represent ATCC:

  
Frank Simione, Acting Director, Patent Depository

Date: November 9, 1995

cc: Karen I. Krupen  
Susan Moran



# American Type Culture Collection

12301 Parklawn Drive • Rockville, MD 20852 USA • Telephone: (301)231-5520 Telex: 898-035 ATCCNORTH • FAX: 301-770-2587

## BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

### INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3  
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2

10

To: (Name and Address of Depositor or Attorney)

Cell Genesys, Inc.  
Attention: Qing Wang  
322 Lakeside Drive  
Foster City, CA 94404

Deposited on Behalf of: Cell Genesys, Inc.

Identification Reference by Depositor:

ATCC Designation

Plasmid, p1K6.1MIP( $\sigma$ )-E2A  
Plasmid, p1K6.1MIP( $\sigma$ )-ORF6

97324  
97325

20

The deposit was accompanied by: a scientific description a proposed taxonomic description  
indicated above.

The deposit was received October 26, 1995 by the International Depository Authority and has been  
accepted.

AT YOUR REQUEST:

☒ We will inform you of requests for the strain for 30 years.

The strain will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right  
to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the strain and ATCC is instructed by the United States  
Patent & Trademark Office or the depositor to release said strain:

30

If the culture should die or be destroyed during the effective term of the deposit, it shall be your  
responsibility to replace it with living culture of the same.

The strain will be maintained for a period of at least 30 years after the date of deposit, and for a period  
of at least five years after the most recent request for a sample. The United States and many other  
countries are signatory to the Budapest Treaty.

The viability of the culture stated above was tested November 2, 1995. At that date the culture was  
viable.

40

International Depository Authority: American Type Culture Collection, Rockville, Md. 20852 USA

Signature of person having authority to represent ATCC:

Frank Simone  
Frank Simone, Acting Director, Patent Depository

Date: November 3, 1995

cc: Karen I. Krupen



# American Type Culture Collection

12301 Parklawn Drive • Rockville, MD 20852 USA • Telephone: (301)231-5520 Telex: 898-055 ATCCNORTH • FAX: 301-770-2587

## BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

### INTERNATIONAL FORM

#### RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3 AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2

10

To: (Name and Address of Depositor or Attorney)

Cell Genesys, Inc.  
Attention: Qing Wang  
322 Lakeside Drive  
Foster City, CA 94404

Deposited on Behalf of: Cell Genesys, Inc.

Identification Reference by Depositor:

ATCC Designation

Human embryonic kidney cell derivative, 293-E4-8

CRL 11711

20

The deposit was accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic description indicated above.

The deposit was received August 30, 1994 by this International Depository Authority and has been accepted.

#### AT YOUR REQUEST:

☒ We will inform you of requests for the strain for 30 years.

The strain will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the strain.

If the culture should die or be destroyed during the effective term of the deposit, it shall be your responsibility to replace it with living culture of the same.

30

The strain will be maintained for a period of at least 30 years after the date of deposit, and for a period of at least five years after the most recent request for a sample. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

The viability of the culture cited above was tested September 2, 1994. On that date, the culture was viable.

International Depository Authority: American Type Culture Collection, Rockville, Md. 20852 USA

Signature of person having authority to represent ATCC:

Date: September 9, 1994

40

Annette L. Bade, Director, Patent Depository

cc: Susan M. Moran ✓

Form BP4/9





# American Type Culture Collection

12301 Parklawn Drive • Rockville, MD 20852 USA • Telephone: (301)201-5520 Telex: 898-055 ATCCNORTH • FAX: 301-770-2587

## BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

### INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3  
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2

10

To: (Name and Address of Depositor or Attorney)

Cell Genesys, Inc.  
Attention: Qing Wang  
322 Lakeside Drive  
Foster City, CA 94404

Deposited on Behalf of: Cell Genesys, Inc.

Identification Reference by Depositor:

ATCC Designation

Plasmid, pIK6.1MIP(a)-E4

75879

20

The deposit was accompanied by: \_\_\_ a scientific description \_\_\_ a proposed taxonomic description  
indicated above.

The deposit was received August 30, 1994 by this International Depository Authority and has been  
accepted.

#### AT YOUR REQUEST:

☒ We will inform you of requests for the strain for 30 years.

The strain will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right  
to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the strain.

If the culture should die or be destroyed during the effective term of the deposit, it shall be your  
responsibility to replace it with living culture of the same.

30

The strain will be maintained for a period of at least 30 years after the date of deposit, and for a period  
of at least five years after the most recent request for a sample. The United States and many other  
countries are signatory to the Budapest Treaty.

The viability of the culture cited above was tested September 2, 1994. On that date, the culture was  
viable.

International Depository Authority: American Type Culture Collection, Rockville, Md. 20852 USA

Signature of person having authority to represent ATCC:

Date: September 6, 1994

40

Annette L. Bade  
Annette L. Bade, Head, ATCC Patent Depository

cc: Susan M. Moran

Form BP4/9

【図 1】

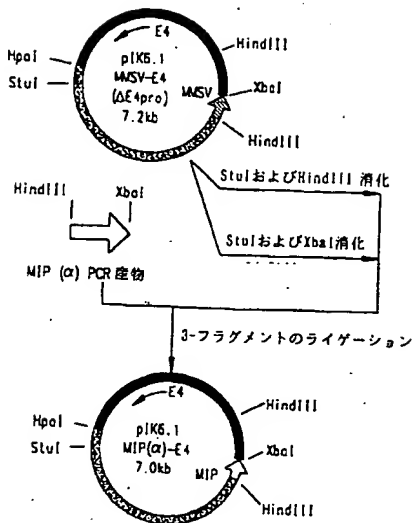


FIG.1

【図 2】

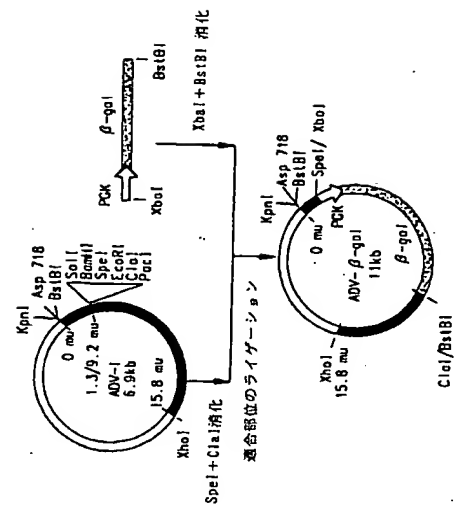


FIG.2

【図 3 A】

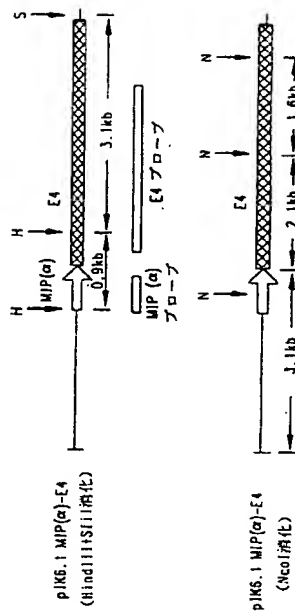


FIG.3A

【図 3 B】

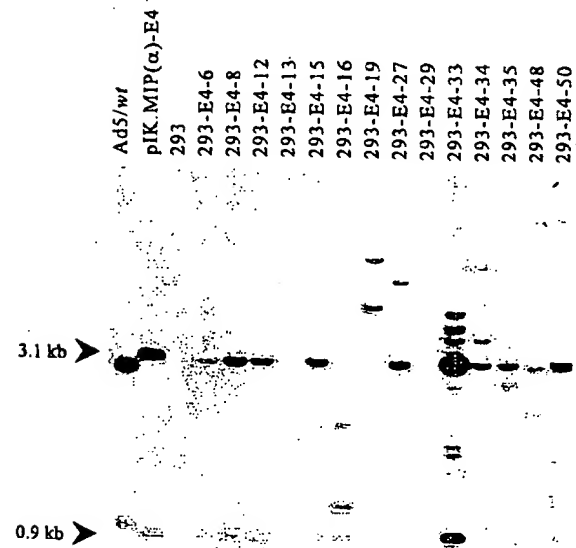
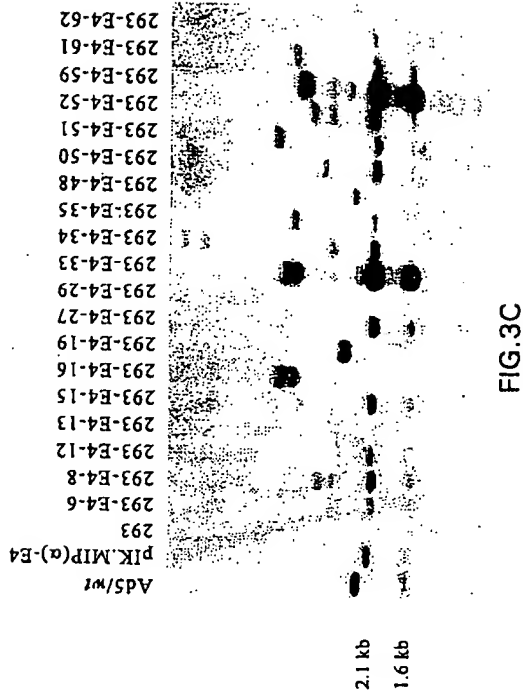
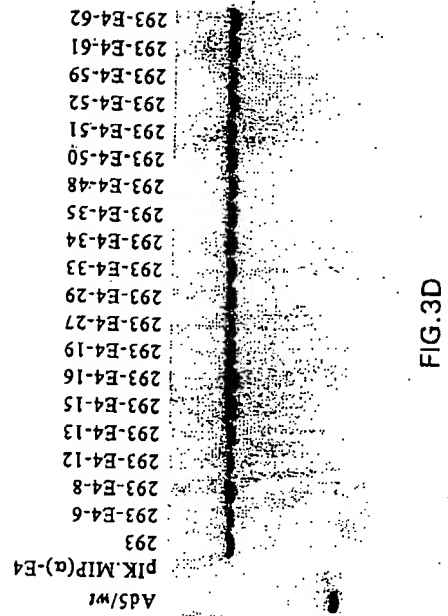


FIG.3B

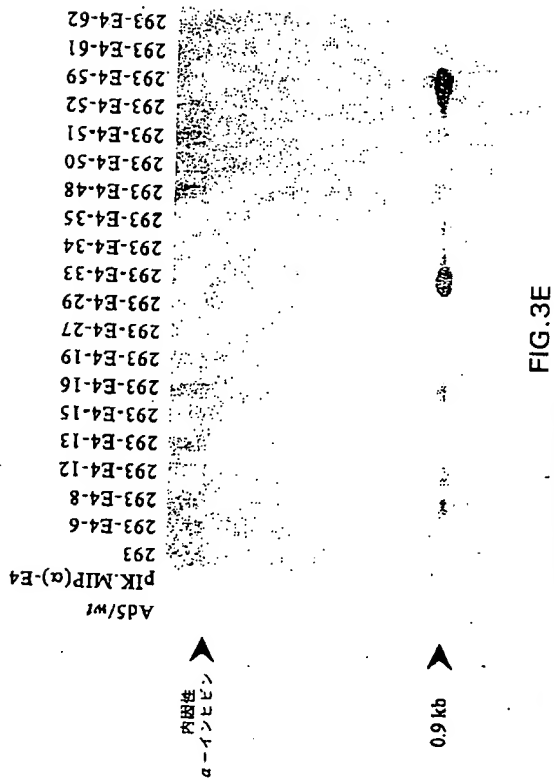
【図3C】



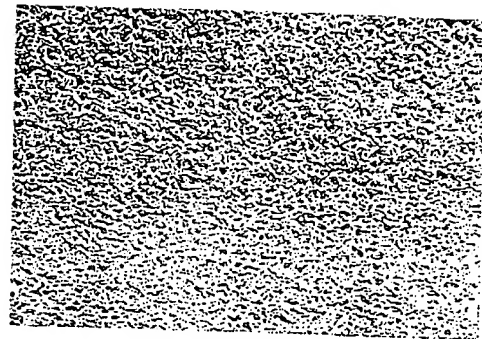
【図3D】



【図3E】



【図4A-B】



【図 4 C - D】



FIG. 4C

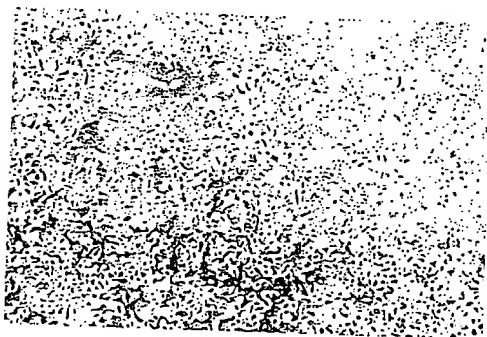


FIG. 4D

【図 4 E - F】

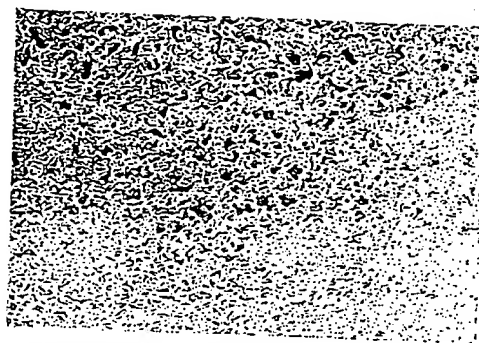


FIG. 4E

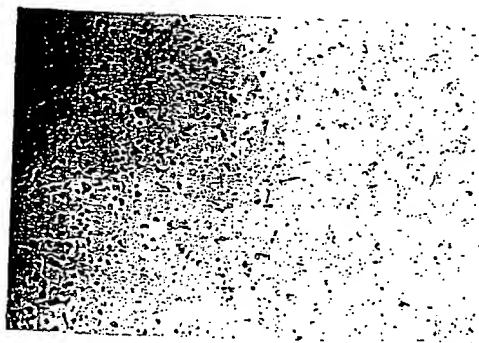


FIG. 4F

【図 4 G - H】

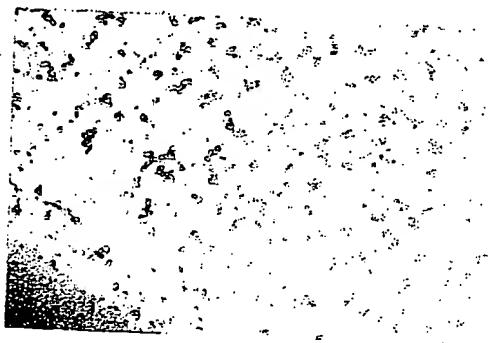


FIG. 4G

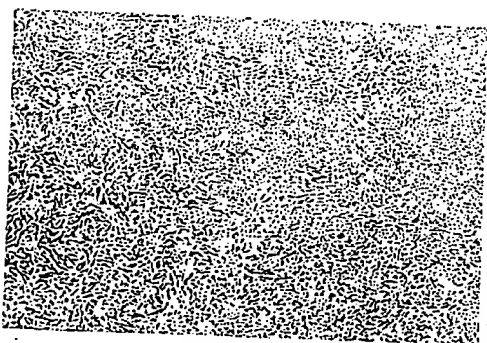


FIG. 4H

【図 4 I - J】

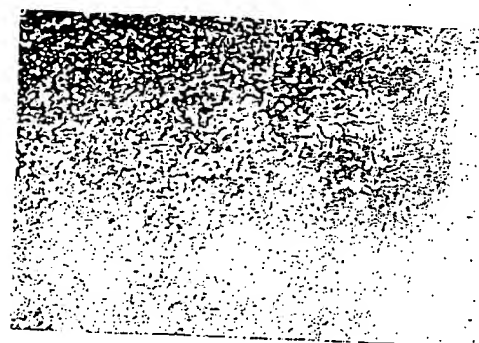


FIG. 4I

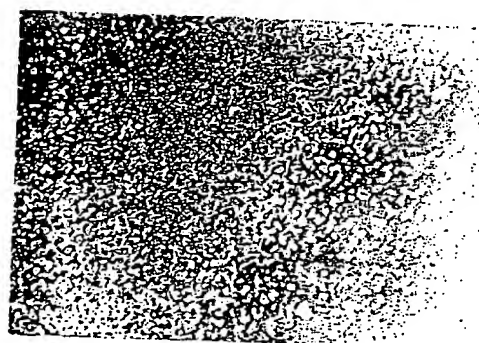
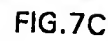
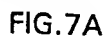


FIG. 4J

【図 6】



【図 7 C - D】



【図 8】

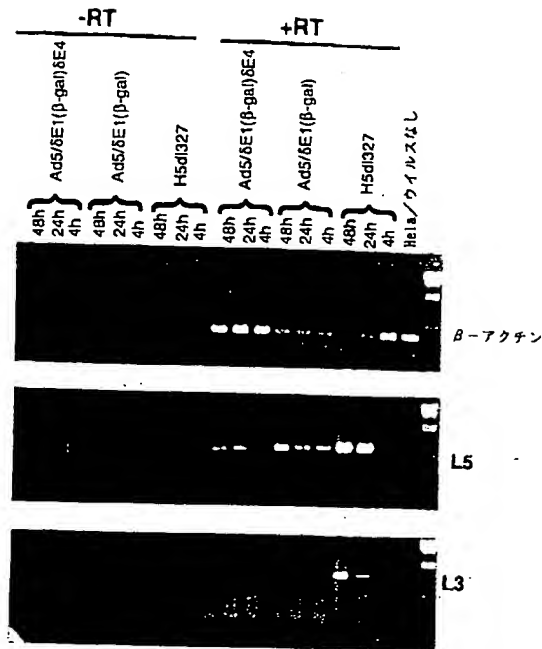


FIG.8

【図 9】

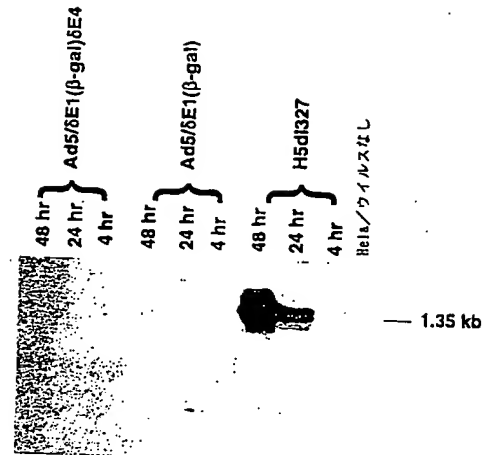


FIG.9

【図 10】

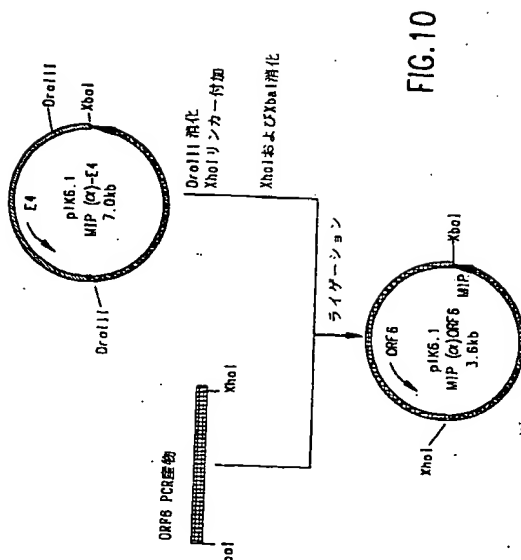


FIG.10

【図 11 A】

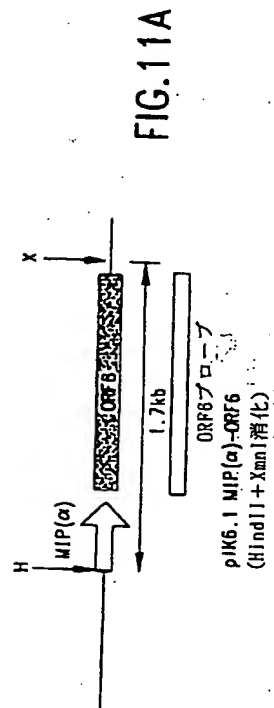


FIG.11A

【図 1 1 B】

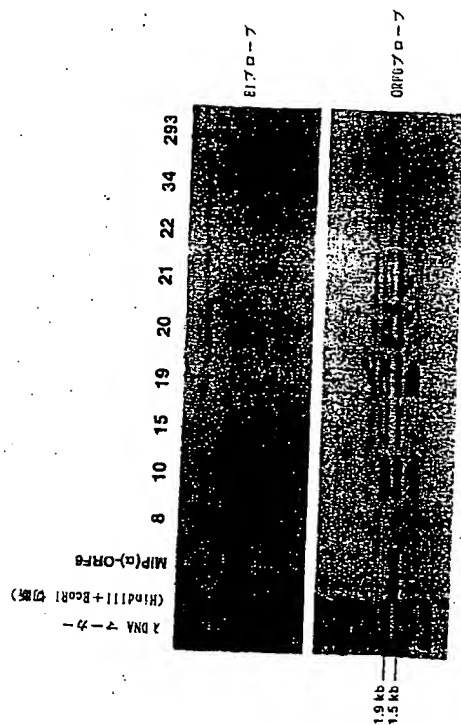


FIG.11

【図 1 2】

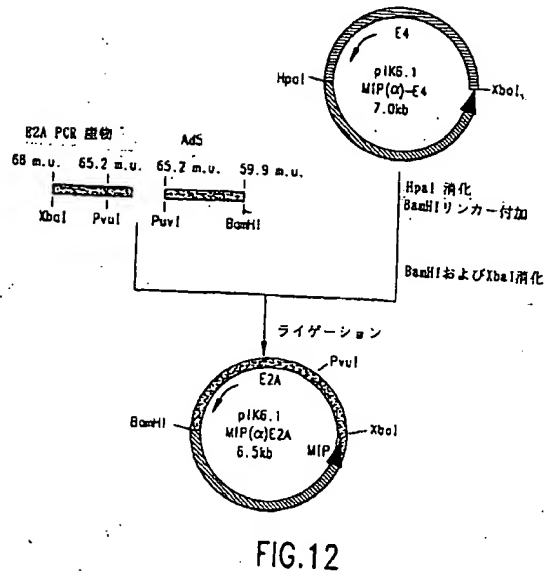


FIG.12

【図 1 3】

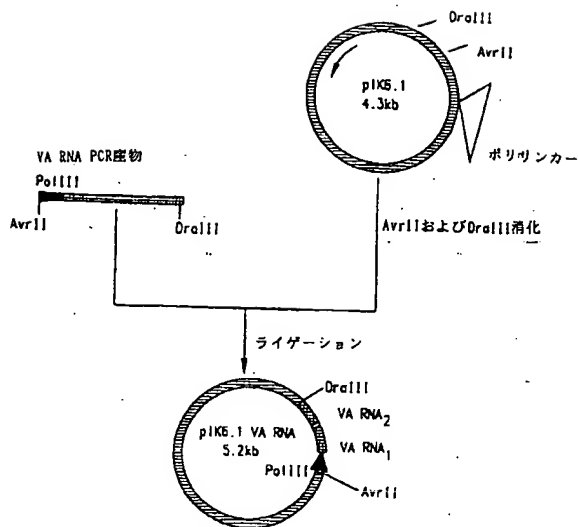


FIG.13

## 【手続補正書】

【提出日】平成20年4月7日(2008.4.7)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

誘導性プロモーターに機能しうる状態で連結されたアデノウイルスE4オープンリーディングフレーム6(ORF6)を含むDNAプラスミド。

## 【請求項2】

誘導性プロモーターがcAMP応答要素(CRE)を含むものである、請求項1に記載のDNAプラスミド。

## 【請求項3】

誘導性プロモーターがCRE結合性タンパクによって制御されるものである、請求項2に記載のDNAプラスミド。

## 【請求項4】

誘導性プロモーターが哺乳動物の $\alpha$ インヒビンプロモーターである、請求項2に記載のDNAプラスミド。

## 【請求項5】

誘導性プロモーターがマウス $\alpha$ インヒビンプロモーターである、請求項4に記載のDNAプラスミド。

## 【請求項6】

誘導性プロモーターが薬剤誘導性テトラサイクリン応答性プロモーターである、請求項2に記載のDNAプラスミド。

## 【請求項7】

誘導性プロモーターに機能しうる状態で連結されたアデノウイルスE2A遺伝子断片をさらに含む、請求項1に記載のDNAプラスミド。

## 【請求項8】

pIK6.1MIP( $\alpha$ )-E4ORF6(ATCC#97325)である、請求項1に記載のDNAプラスミド。

## 【請求項9】

pIK6.1MIP( $\alpha$ )-E4(ATCC#75879)である、請求項1に記載のDNAプラスミド。

## 【請求項10】

トランスジーン、E1初期遺伝子領域における致命的欠失または変異、およびE4初期遺伝子領域の必須小域における致命的欠失または変異を含む組換えアデノウイルスベクターであって、組換えアデノウイルスがE1およびE4-ORF6アデノウイルス初期遺伝子領域の複製の補完を必要とするものである組換えアデノウイルスベクター。

## 【請求項11】

E2Aにおける致命的欠失または変異、およびE3初期遺伝子領域における欠失または変異の一方あるいは両方をさらに含む、請求項10に記載の組換えアデノウイルスベクター。

## 【請求項12】

トランスジーンがサイトカイン遺伝子、自殺遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、防御遺伝子、またはウイルスタンパクをコードする遺伝子である、請求項10または11に記載の組換えアデノウイルスベクター。

## 【請求項13】

複製欠損性アデノウイルスベクターの作製方法であって：



(a) 請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の DNA プラスミドを含み、前記組換えアデノウイルスベクターの複製を支持するパッケージング細胞系に、トランスジーン、E 1 初期遺伝子領域における致死的欠失または変異、および E 4 初期遺伝子領域における致死的欠失または変異を含む組換えアデノウイルスベクターを導入し、

(b) 前記複製欠損性アデノウイルスをレスキューする、ことを特徴とする方法。

【請求項 1 4】

複製欠損性アデノウイルスベクターの作製方法であって：

(a) 請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の DNA プラスミドを含み、前記組換えアデノウイルスベクターの複製を支持するパッケージング細胞系に、トランスジーン、E 1 初期遺伝子領域における致死的欠失または変異、および E 2 A 初期遺伝子領域における致死的欠失または変異を含む組換えアデノウイルスベクターを導入し、前記組換えアデノウイルスの複製を支持し、

(b) 前記複製欠損性アデノウイルスをレスキューする、ことを特徴とする方法。

【請求項 1 5】

哺乳動物標的細胞におけるトランスジーンを発現方法であって：

(a) 前記標的細胞に請求項 1 3 または 1 4 に記載の方法で作製された複製欠損性アデノウイルスを感染させ、

(b) 前記標的細胞において前記トランスジーンを発現させる、ことを特徴とする方法。

【請求項 1 6】

トランスジーンがサイトカイン遺伝子、自殺遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、防御遺伝子、またはウイルスタンパクをコードする遺伝子である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 3 または 1 4 に記載の方法で作製された複製欠損性アデノウイルスが感染した哺乳動物標的細胞。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 31/00 (2006.01)

A 6 1 P 31/00

(72)発明者 フィナー, ミッチェル, エイチ.

アメリカ合衆国 9 4 0 7 0 カリフォルニア州, サン カルロス, マデラ 5 4

(72)発明者 ジア, ジャオーチ

アメリカ合衆国 9 4 4 0 3 カリフォルニア州, サン マテオ, バーバンク アベニュー 6 4

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA01 DA02 EA02 FA02 FA20 GA11 HA17

4B065 AA90X AA95Y AB01 AC20 BA02 CA44

4C084 AA13 NA13 NA14 ZB261 ZB321

4C085 AA03 BB23 CC21

4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA13 NA14 ZB26 ZB32